

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR – UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Importância do tecido linfóide associado ao intestino na infecção pelo VIH e suas implicações terapêuticas

- Dissertação de Mestrado -

Joana Alves Cordeiro e Cunha

2012/2013

Importância do tecido linfóide associado ao intestino na infecção pelo VIH e suas implicações terapêuticas

Autoria:

Joana Alves Cordeiro e Cunha¹

Orientação:

Professor Doutor Carlos Alberto da Silva e Vasconcelos²

¹Aluna do sexto ano profissionalizante do Mestrado Integrado em Medicina

Afiliação: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar/ Centro Hospitalar do Porto - Universidade do Porto - Rua de Jorge Viterbo Ferreira, nº 228, 4050-313 Porto

Endereço electrónico: joanacunha89@hotmail.com

²Chefe de Serviço da Unidade de Imunologia Clínica do Hospital Geral de Santo António e Professor Associado Convidado do ICBAS

Afiliação: Unidade de Imunologia Clínica – Hospital Geral de Santo António - Centro Hospitalar do Porto / Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto

*A autora informa que esta Obra não foi escrita seguindo o Novo Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa.

I. Agradecimentos

Gostaria antes de tudo de muito de agradecer ao Prof. Dr. Carlos Vasconcelos, que aceitou o meu pedido para orientar a minha tese de mestrado, permitindo-me entrar neste mundo incrível e simultaneamente horrendo que é o VIH.

II. Índice

I. Agradecimentos	2
II. Índice.....	3
III. Lista de siglas e abreviaturas	5
IV. Glossário.....	7
V. Resumo – Abstract	9
VI. Introdução	11
VII. O GALT como órgão imune	13
VIII. Patogénese do VIH-1 no intestino.....	15
A. Depleção de células T CD4 ⁺	15
B. Desregulação das células B	16
C. Perda da barreira epitelial da mucosa intestinal	17
1. Mecanismos de disfunção da barreira mucosa induzida por VIH	17
2. Translocação bacteriana e activação imune	18
3. Células Th17	20
4. Células T reguladoras e outras células do GALT	22
5. Consequências da activação imune	23
D. A fibrose no GALT.....	24
IX. Alteração na expressão de genes na mucosa intestinal.....	26
X. O GALT como santuário farmacológico.....	27
XI. Efeito da terapia HAART na reconstituição do GALT.....	29
XII. Intervenções terapêuticas potenciais	33
A. Intervenções terapêuticas potenciais para diminuir a AI	33
B. Intervenções terapêuticas potenciais para restaurar as células Th17 do GALT ou a sua função	33
C. Potenciais intervenções para diminuir a fibrose no GALT.....	34
D. Intervenções terapêuticas potenciais para ultrapassar o santuário farmacológico e o reservatório no GALT	34
XIII. Conclusões	36
XIV. Bibliografia – Referências	38
XV. Anexos	49
A. Quadros e tabelas	49
1. Quadro 1	49

2. Quadro 2	54
3. Quadro 3	55
B. Legendas	56
1. Quadros	56

III. Lista de siglas e abreviaturas

AI - Activação Imune

APC - Antigen-presenting cell / Célula apresentadora de antígeno

ART - Anti-retroviral therapy/ Terapêutica anti-retrovírica

CMV - Citomegalovírus

DC - Dendritic cell / Célula dendrítica

EndoCAb - Endotoxin Core Antibodies

GALT - Gut Associated Lymphoid Tissue / Tecido linfóide associado ao intestino

IL - Interleucina

ILF - Isolated lymphoid follicle / Folículo linfóide isolado

INF- γ - Interferon- γ / Interferão- γ

HAART - Highly Active Anti-retroviral Therapy / Terapêutica anti-retrovírica altamente eficaz

LN - Lymph node / Gânglio linfático

LP - Lamina propria

LPS - Lipopolissacarídeo

LTNP - Long term non progressors / Indivíduos não progressores a longo prazo

MALT - Mucose associated lymphoid tissue / tecido linfóide associado às mucosas

NK - Células natural killer

pDC - Plasmacytoid dendritic cell / Célula dendrítica plasmacitóide

PP - Placa de Peyer

RALT - Rectal associated lymphoid tissue / Tecido linfóide associado ao recto

RCT - Randomised clinical trial / Ensaio clínico randomizado

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

Th - T helper cell / Célula T auxiliar

TLR - Toll-Like Receptor

Treg - Célula T reguladora

VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana

VIH-1 - Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1

VIS - Vírus da Imunodeficiência Símia

IV. Glossário

CD4 – proteína encontrada na superfície de um subtipo de linfócitos T, os linfócitos T auxiliares, mas também é expressa na superfície de monócitos e macrófagos e das células dendríticas. Este funciona como receptor para o VIH, sendo que este se liga ao CD4 através da proteína gp120 na sua superfície (1).

Células B CD21⁺CD27⁺ - subtipo de células B de memória capaz de produzir anticorpos por activação policlonal, sem necessitar de estimulação por parte das células T (2).

Controladores de elite – correspondem a menos de 1% pacientes infectados, conseguem manter cargas virais indetectáveis (menos de 75 cópias/mL) mesmo não tratados com HAART. [Madec *et al.* (2005), citados por Hunt *et al.* (2008)].

Co-receptor viral – os dois principais co-receptores são o CCR5 e CXCR4, e estas duas moléculas que se encontram à superfície do linfócito, são moléculas que pertencem à família dos receptores transmembranares acoplados à proteína G. Conjuntamente com o receptor CD4, são necessários para que se dê a ligação, fusão e entrada eficientes do VIH-1 para dentro da célula (1).

Cura esterilizante – situação em que há completa erradicação do vírus /completa eliminação de todas as formas virais competentes para a replicação, não restando reservatórios virais no organismo [Dieffenbach & Fauci (2011), citados por Eisele & Siliciano (2012)].

Cura funcional – situação em que há controlo permanente da replicação viral sem terapêutica [Dieffenbach and Fauci, (2011), citados por Eisele & Siliciano (2012)].

HAART supressiva - aquela que leva à diminuição do número de cópias de RNA viral para valores inferiores a 50 ou 20 cópias/mL, dependendo do ensaio utilizado para a quantificação [Zhang *et al.* (1998), citados por Evering *et al.* (2012)].

Infecção aguda pelo VIH – período até ao dia 100 após transmissão do VIH-1 [McMichael *et al.* (2010), citados por Siewe & Landay (2012)].

Indivíduos LTNP – Indivíduos não progressores a longo prazo, representam 5 a 10% dos indivíduos infectados pelo VIH-1 e são naturalmente capazes de suprimir as cargas virais, manter as contagens de T CD4⁺ periféricas normais,

mantendo-se clinicamente saudáveis por mais de 10 anos na ausência de qualquer ART [Valdez *et al.* (2002), citados por Sankaran *et al.* (2005)].

Reservatório viral – os reservatórios para o VIH podem ser divididos em duas categorias – a primeira, correspondendo a tecidos linfóides que providenciam ao VIH uma grande abundância de células-alvo, contactos próximos que permitem uma propagação eficiente célula a célula, e penetração reduzida de fármacos; e a segunda, reservatórios celulares que consistem principalmente em células T CD4⁺ altamente susceptíveis à replicação por VIH quando activadas, mas que também podem transportar o vírus em forma latente (3). Até ao momento, o único reservatório celular que se coaduna com esta definição é o reservatório latente em células T CD4⁺ em repouso (4).

Santuário viral – um local onde a penetração dos fármacos anti-retrovíricos é limitada, o que permite uma replicação viral persistente (4).

Quasi-espécies virais – colecção de diversas variantes virais do VIH-1 que existem no indivíduo infectado, geradas pelas altas taxas de mutação [Overbaugh & Bangham (2001), citados por van Marle *et al.* (2010)].

V. Resumo – Abstract

Introdução – Nos últimos anos cada vez mais importância tem sido dada à patogénese da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) no intestino. O tecido linfóide associado ao intestino (GALT) é um alvo muito precoce do vírus no decurso da infecção, onde ocorre uma depleção muito severa de células T CD4⁺ com uma restauração muito pobre sob terapêutica anti-retrovírica altamente eficaz (HAART), em comparação com aquelas do sangue periférico. Para além disto, dá-se muito precocemente uma disrupção da barreira intestinal epitelial que permite a translocação de microorganismos e de productos microbianos a partir do lúmen intestinal que activam o sistema imunitário. Esta activação imune contribui para um conjunto de efeitos deletérios, relacionados ou não com o síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), para o estado de saúde global dos pacientes infectados, está directamente associada com a progressão da doença, e é um preditor de mortalidade independente das viremias e das contagens de CD4⁺.

Objectivos – Nesta dissertação, a autora pretende elaborar uma revisão globalizada das publicações científicas mais recentes e mais relevantes para este tópico, clarificar a importância do GALT na infecção pelo VIH e as implicações da sua patogénese a nível intestinal relativamente a novas potenciais abordagens terapêuticas na procura de uma cura para esta infecção.

Conclusões – Mais investigação é necessária para clarificar as causas desta depleção persistente das células CD4⁺ no GALT, o efeito da HAART nesta depleção e na reparação da disfunção da barreira mucosa intestinal, dado que a literatura publicada é contraditória, assim como é de importância fulcral a investigação de novos agentes ou abordagens terapêuticas para diminuir a activação imune, a fibrose, e para a erradicação dos reservatórios virais.

Palavras-chave – VIH, tecido linfóide associado ao intestino, CD4⁺, barreira mucosa intestinal, translocação microbiana, activação imune, HAART, Th17, Tregs, fibrose.

Introduction – In the past recent years more and more importance has been and is being given to the pathogenesis of the human immunodeficiency virus (HIV) infection in the gut. The gut associated lymphoid tissue (GALT) is a very early target of the virus in the course of the infection, where a very severe depletion of the CD4⁺ T cells occurs with a very poor restoration under highly active anti-retroviral therapy (HAART), comparing with those in the peripheral blood. Furthermore, there is prematurely a disruption of the intestinal epithelial barrier that allows the translocation of microbes and microbial products from the intestinal lumen that activate de immune system. This immune activation contributes to a set of deleterious effects, related and non-related to the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), to the overall health status of the infected patients, it is directly associated to the disease progression and is a mortality predictor independent of viremia and CD4⁺ T counts.

Objectives – In this dissertation the author intends to elaborate a globalized review of the more recent and more relevant scientific publications to this topic, to clarify the importance of the GALT in the HIV infection and the implications of its intestinal pathogenesis in potential new therapeutic approaches in the search of a cure to this infection.

Conclusions – More investigation is needed to clarify the causes of this persistent CD4⁺ T cells depletion in the GALT, the effect of the HAART in this depletion and in the repair of the gut mucosal barrier dysfunction, given that the published literature is contradictory, as is of central importance the research for new agents or therapeutic approaches to diminish immune activation, fibrosis, and to the eradication of the viral reservoirs.

Keywords – HIV, gut-associated lymphoid tissue, CD4⁺, intestinal mucosal barrier, microbial translocation, immune activation, HAART, Th17, Tregs, fibrosis.

VI. Introdução

Em 1997, foi pela primeira vez possível reduzir os níveis de RNA do vírus da imunodeficiência humana (VIH) plasmáticos para níveis inferiores aos limites de detecção dos ensaios clínicos (50 cópias/mL) com uma combinação de três fármacos anti-retrovíricos, abordagem à qual se deu o nome de terapêutica anti-retroviral altamente eficaz - HAART [Perelson *et al.* (1997), citados por Eisele & Siliciano (2012)]. Com a adesão adequada, os pacientes que iniciam este tratamento precocemente apresentam uma longevidade quase igual à dos indivíduos não-infectados [Mills *et al.* (2011), citados por Eisele & Siliciano (2012)].

A infecção pelo VIH foi inicialmente etiquetada como uma patologia malabsortiva devido à apresentação inicial comum de disfunção gastrointestinal [Reeders *et al.* (2004), citado por Sankaran (2008)]. Antes da era da HAART, era muito comum o desenvolvimento de diarreia e disfunção gastrointestinal antes do desenvolvimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (5). Em 1984 descreveram-se, pela primeira vez, anormalidades histológicas específicas na *lamina propria* (LP) de biópsias da mucosa jejunal e rectal em indivíduos VIH positivos [Kotler *et al.*, citados por Costiniuk *et al.* (2012)].

O intestino e o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) são, seguindo-se ao timo, o local onde se encontra maior número de células imunes, e onde entre 60% a 70% dos linfócitos do nosso organismo se localizam (6). Estão, assim, lotados de alvos para o VIH - as células T auxiliares (*Th*), que expressam à sua superfície a molécula CD4, fazendo destes locais um dos primeiros e mais importantes alvos do vírus (7-9), independentemente da via de transmissão, durante a infecção aguda. Dá-se aqui, muito precocemente na infecção, uma depleção grave de células T CD4⁺ (8, 10), ocorrendo acometimento da função intestinal mesmo antes da seroconversão (7). O GALT, conjuntamente com o tecido linfóide associado ao recto (RALT), é um dos locais de maior replicação viral em pacientes não suprimidos e funciona como um santuário (11), e como um reservatório (12, 13) para o VIH-1. No GALT, as concentrações virais são mais elevadas que no sangue em pacientes sob HAART (14), e há um atraso substancial na restauração das células T CD4⁺ da

mucosa intestinal após o início desta terapêutica comparativamente àquelas no sangue periférico (10, 15).

VII. O GALT como órgão imune

Estrutural e funcionalmente, o nosso sistema imunitário consiste em duas divisões *major* – um sistema interno que lida com substâncias que ultrapassaram as barreiras cutâneas e mucosas, que consiste em órgãos linfóides no interior do organismo; e um sistema externo, o tecido linfóide associado às mucosas (MALT), que consiste numa rede extensa de células e produtos celulares ao longo das mucosas gastrintestinal (GALT), respiratória, genito-urinária, ocular e da glândula mamária, que estão em contacto substâncias estranhas que são responsáveis pelas respostas imunes das mucosas, impedindo a penetração destas (6).

As células imunes, activadas num local mucoso particular, denominado local indutivo, captam, processam e apresentam os antígenos, e posteriormente viajam para o mesmo ou outros locais da mucosa através do sistema linfático ou da corrente sanguínea, para os locais efectores, resultando na protecção generalizada das mucosas (6). No caso do GALT, estes linfócitos migram para os gânglios linfáticos mesentéricos onde se dividem várias vezes, entram na corrente sanguínea e voltam para um local epitelial próximo ao local de indução ou para outros locais efectores (6).

No GALT, o maior componente do MALT, o tecido linfóide está distribuído ao longo de estruturas como os gânglios linfáticos (LN) mesentéricos, a *lamina propria* (LP) com as placas de Peyer (PP) no íleo [semelhantes a LN, na mucosa e submucosa (16)], ou como agregados linfóides mais difusos (6, 16). Realçam-se a arquitectura característica do epitélio, as células apresentadoras de antígeno (APCs) [células dendríticas (DCs) e macrófagos], células T, e áreas de células B, com centros germinativos na LP, e células *natural killer* (NK). Muito importantes são as células M (de *Microfold*), células especializadas localizadas no epitélio que cobre as PP, no apêndice, em folículos linfóides isolados (ILFs) e nas pontas das vilosidades (6), caracterizadas por uma invaginação da membrana basolateral - a cúpula subepitelial - ocupada por linfócitos e APCs, e com microvilosidades que providenciam uma porta de entrada para o MALT (6). Recolhem substâncias a partir do lúmen e entregam-nas às APCs adjacentes (6). As células epiteliais fazem a amostragem do microambiente intestinal, discriminando microorganismos comensais dos patogénicos e influenciando a função das

APCs e linfócitos (6). Os linfócitos intraepiteliais e os da LP e os são células efectoras, nos locais efetores do GALT (16). Mais de 80% dos linfócitos intraepiteliais são células T CD8⁺ (16).

As DCs, um conjunto de várias populações de APCs, participam na manutenção da tolerância relativamente à microflora comensal e na geração de respostas imunes protectoras contra patógenos (6). Subepitelialemente estendem as suas dendrites entre as *tight junctions* dos enterócitos, podendo analisar conteúdos luminais (6).

O GALT medeia a tolerância imunitária relativamente às bactérias comensais enquanto simultaneamente gera uma resposta imunitária contra patógenos que atravessam a barreira epitelial, duas funções homeostáticas contrárias. Vários mecanismos contribuem para este equilíbrio, como as funções de dois tipos de células T - as células T reguladoras (Tregs) e as células Th17, ambas CD3⁺CD4⁺ (sobre as quais a autora incidirá mais pormenorizadamente adiante) (17); a camada contínua de células epiteliais e suas *tight junctions* que formam uma barreira física contra a penetração de patógenos; a camada de muco e glicocálice na face apical das células epiteliais; e a produção de várias moléculas anti-microbianas pela mucosa [Neutra *et al.* (2001), citados por Paiardini *et al.* (2008)].

VIII. Patogénese do VIH-1 no intestino

A. Deplecção de células T CD4⁺

Aquando da transmissão do vírus, estabelece-se uma população viral fundadora na mucosa com a qual este entrou em contacto, dando-se seguidamente o transporte viral para os LN e outros tecidos linfóides, particularmente o GALT, o que resulta num pico de viremia. Após a início de respostas imunes anti-virais a carga viral diminui até um nível estabilizado, descrito como *set point* viral [Centlivre *et al.* (2007), citados por Siewe & Landay (2012)].

A infecção aguda pelo VIH-1 é uma fase crítica em que se determina a progressão da doença (8). Durante esta fase, o RNA viral é detectado em 0,01-1% das células T periféricas, mas em 60% das células T de memória das mucosas (18). O GALT é o local onde se dá a deplecção mais substancial de células CD4⁺ em todos os estadios da doença, deplecção esta que afecta preferencialmente as células CCR5⁺CD4⁺ (18). Aqui, mais de 98%, comparativamente a menos de 20% na periferia, das células T CD4⁺ expressam o co-receptor CCR5 do VIH-1, o que pode explicar, pelo menos parcialmente, esta diferença na percentagem de infecção das células CD4⁺ entre os dois locais (8, 18). O GALT apresenta também um número significativamente maior de células T activadas e em proliferação, alvo preferencial do vírus (19), relativamente ao sangue periférico (20). Para além da morte por invasão das células susceptíveis há também extensa morte por apoptose de células espectadoras (21).

Mattapallil *et al.* (22) demonstraram que 10 dias depois da infecção 60% das células T CD4⁺ da mucosa estavam infectadas, e 4 dias depois 80% destas células desapareciam, coincidindo com a diminuição na carga viral plasmática, dando-se esta deplecção numa proporção não observada no sangue periférico (18, 23, 24). Esta deplecção é mais marcada em locais efectores como na LP (8) mas ainda ocorre em menor grau em locais indutivos (16). Por altura do estabelecimento do *set point* viral, cerca de 80% das células CD4⁺ do GALT já estão destruídas (18, 25).

Simultaneamente à perda precoce de células CD4⁺ no GALT dá-se aqui também uma grande infiltração de células T CD8⁺ (15, 26, 27), havendo um

desequilíbrio na resposta imunitária do hospedeiro (7). Uma vez que as células T CD8⁺ que infiltram o GALT estão provavelmente em activação constante devido à presença de grandes estímulos antigénicos (10), a perda de CD4⁺ sugere que se desenvolva uma grande resposta citotóxica não específica aos antígenos virais e produção de cito e quimiocinas pró-inflamatórias que danificam a barreira epitelial [Resnick *et al.* (2006), citados por Sankaran *et al.* (2008)].

Ao longo da infecção crónica as contagens de CD4⁺ periféricas vão diminuindo lentamente, perda que pode ser parcialmente revertida pela HAART. Por sua vez, no GALT, sofrem uma depleção muito rápida e profunda nos primeiros dias após a infecção mantêm-se baixas durante o curso da doença (8). Recentemente mostrou-se que, comparativamente ao compartimento sanguíneo, há um atraso substancial na restauração das células T CD4⁺ da mucosa intestinal após a iniciação da HAART (10, 15) e mesmo após anos de HAART, esta perda é apenas parcialmente reversível na maioria dos pacientes (28).

Inicialmente pensou-se que este defeito de células CD4⁺ na mucosa imune tivesse consequências graves para a globalidade do sistema imunitário, influenciando a progressão da doença. No entanto, em macacos infectados o VIS depleta as células T do GALT haja ou não uma evolução para SIDA símia, havendo perda de células T CD4⁺ do GALT a uma taxa semelhante durante a infecção aguda em ambos os casos (29, 30).

B. Desregulação das células B

O impacto da infecção nas células B do GALT não está tão bem estudado como aquele relativo às células T CD4⁺. Levesque *et al.* (31) descreveram que tão precocemente como aos 17 dias pós-transmissão, houve uma diminuição aguda das células B *naive* e aumentos significativos das células B de memória e plasmócitos no sangue e íleo terminal. Pouco depois, houve danificação dos centros germinativos do GALT, com lise folicular devido à rápida activação policlonal, diferenciação e apoptose das células B. No modelo símio, Das *et al.* (2, 32) descreveram que o subgrupo CD21⁺CD27⁺ das células B de memória é selectivamente atingido durante a infecção pelo VIS. Deve ainda ser

investigado o papel das células B de memória CD21⁺CD27⁺ do GALT na patogénese do VIH.

C. Perda da barreira epitelial da mucosa intestinal

A infecção por VIH também induz alterações estruturais da mucosa intestinal e alterações nos microorganismos comensais intestinais (9). Esta alteração foi denominada por enteropatia por VIH, expressão inicialmente usada para indicar a condição de diarreia não associada a patógenos, histologicamente caracterizada por infiltrados inflamatórios linfocitários, atrofia e redução da área de superfície das vilosidades, apoptose das células epiteliais e hiperplasia críptica da LP [Kotler *et al.* (1984), citados por Epple *et al.* (2012)]. Importantíssimo na imunidade gastrointestinal é a capacidade do epitélio funcionar como uma barreira, sendo a sua integridade necessária para prevenir a translocação de material antigénico do lúmen intestinal para a circulação sistémica, onde induziria activação imune (AI) (33). Os pacientes infectados pelo VIH apresentam defeitos nesta barreira, traduzidos por diminuição da resistência epitelial, aumento da permeabilidade, níveis elevadíssimos de apoptose epitelial, expressão aumentada de claudina-2 formadora de poros e redução da expressão de claudina-1 nas *tight junctions*, diminuição da produção de citocinas da mucosa e atrofia das vilosidades (34).

1. Mecanismos de disfunção da barreira mucosa induzida por VIH

As propriedades de impermeabilidade do epitélio intestinal são devidas a uma monocamada de células epiteliais colunares intimamente unidas por *tight junctions* intercelulares (35). Epple *et al.* (34) e Sankaran *et al.* (7) estudaram o defeito na barreira e observaram que este é devido a alterações na composição de proteínas das *tight junctions*, aumento da apoptose epitelial, e que as citocinas como a IL-2, IL-4 e o TNF- α são os mediadores destas alterações.

Depois de vários estudos efectuados pensou-se que esta disfunção na barreira também resultasse da depleção massiva de células T CD4⁺ (24, 36-

38). No entanto, num estudo recente de Epple *et al.* observaram-se, na infecção aguda, números aumentados em vez de diminuídos de células T CD4⁺ da mucosa relacionados com danos na barreira, a maioria das quais apresentava o fenótipo das células de memórias efectoras (27), e encontraram também uma expressão significativa de perforina das células T CD8⁺ (27), associada a aumento das células epiteliais apoptóticas. Concluíram que, antes de ocorrer a depleção das células CD4⁺ no GALT, a infecção aguda induz infiltração da mucosa com células CD4⁺ de memória efectoras activadas e com CD8⁺, o que pode ser interpretado como uma tentativa do organismo de combater o vírus num local-alvo *major* da infecção aguda, e que este defeito da barreira é já evidente na infecção aguda mas que não está relacionado com a depleção de CD4⁺, por outro lado podendo ser iniciado pela actividade das células CD8⁺ citotóxicas.

2. Translocação bacteriana e activação imune

O defeito na barreira que se estabelece precocemente na infecção aguda permite que haja a translocação de micróbios e produtos microbianos, sem a ocorrência evidente de bacteriemia, que, de outra forma, permaneceriam no lúmen intestinal (36).

Em 2006, numa das investigações pioneiras no estudo da translocação microbiana na infecção por VIH, Brenchley *et al.* (36) relataram níveis de lipopolissacarídeo (LPS)(componente da parede celular das bactérias Gram-negativas plasmático) superiores em doentes cronicamente infectados e em macacos *rhesus* infectados com o VIS, comparativamente a indivíduos não infectados, e correlacionaram a sua bioactividade *in vivo* com a AI. Interessantemente, não houve evidências de ocorrência de translocação microbiana nem de níveis elevados de AI em macacos hospedeiros naturais do VIS (que não progridem para SIDA), mesmo havendo depleção massiva de CD4⁺ no GALT (29, 30, 36, 39). Mais do que isso, sugeriram que a replicação viral tenha um papel central na perpetuação da translocação microbiana (já que a HAART associou-se a diminuição dos níveis de LPS), e associaram também a redução do LPS plasmático após início da HAART com a reconstituição de células CD4⁺ (36).

Hunt *et al.* (37) observaram que os controladores de elite apresentam níveis de LPS semelhantes a pacientes com cargas virais superiores, e que a activação das células T está associada a declínio dos CD4⁺ mesmo que não se detecte replicação viral. Assim, mostraram que o LPS em controladores de elite se correlacionava com a AI, com contagens de CD4⁺ menores e com activação de CD8⁺ maior, o que sugere que a AI seja prejudicial e possa levar a perda de células T CD4⁺, apesar da carga viral suprimida, e que a translocação bacteriana poderá ser o factor activante, confirmando um dos resultados de Brenchley (37).

Desde então vários estudos postularam que a translocação destes produtos (como o LPS, peptidoglicano, flagelina, e DNA bacteriano) seja o motor principal de uma AI persistente que apresenta efeitos deletérios para o estado do doente (24, 26, 33, 36, 40-42). O LPS que atinge a corrente sanguínea liga-se ao CD14 (plasmático ou nas membranas de monócitos e macrófagos) e a outros complexos, resultando na produção de várias citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-1 [Giovannini *et al.* (2007), citados por Sandler *et al.* (2011)]. Os níveis e os efeitos do LPS circulante podem ser modulados pela proteína ligadora de LPS (LBP) [Hailman *et al.* (1998), citados por Papasavvas *et al.* (2009)], CD14 solúvel [Wright *et al.* (1990), citados por Papasavvas *et al.* (2009)], anticorpos produzidos contra o núcleo oligossacarídico do LPS (EndoCAb) [Strutz *et al.* (1999), citados por Papasavvas *et al.* (2009)] e gelsolina plasmática (que se pode ligar à actina e ao LPS) [Bucki *et al.* (2005), citados por Papasavvas *et al.* (2009)]. Concluiu-se que os níveis circulantes de LPS como um marcador de translocação microbiana são um forte preditor de progressão da doença independentemente das contagens de CD4⁺ e viremias (36, 38, 43).

Um estudo de Papasavvas *et al.* em pacientes que interrompiam a HAART (44) defende que AI não depende somente do LPS plasmático mostrando que, após curta suspensão da HAART (por um período inferior a 12 semanas), não se observaram alterações no LPS, apesar de ter aumentado a viremia e os níveis de activação de células T.

A relação entre a translocação microbiana e a AI não é clara, mas é possível e lógico que haja um círculo vicioso – uma disrupção da barreira inicial (que, como já observado, pode ser despoletada pela actividade exuberante de células T CD8⁺) permite a translocação de produtos bioactivos *in vivo*, o que activa o sistema imunitário que causa ainda maior disfunção e dano

na barreira (45). De qualquer das formas, é claro que esta AI providencia grandes números de T CD4⁺ activadas que são óptimos alvos virais. Para além disto, os produtos microbianos intestinais podem despoletar a morte celular induzida por activação (46).

A AI caracteriza-se por uma elevada expressão de marcadores de activação (como o CD38⁺ na células CD8⁺ e CD4⁺) e exaustão das células imunes (células T CD4⁺ e CD8⁺, B, NK, macrófagos), aumento da proliferação linfocitária e anormalidades na regulação do seu ciclo celular, altas taxas de apoptose em tecidos linfocitários, níveis séricos elevados de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, e fibrose extensa dos tecidos linfóides (3, 47).

Nilsson *et al.* (48) descreveram que a AI é *determinada durante a fase precoce da infecção pelo VIH-1*. Mecanismos implicados na sua génese incluem:

1. Resposta do sistemas imunitário aos antígenos do VIH-1 (47, 49);
2. Ligação directa de proteínas do virião às proteínas celulares das células do sistema imunitário (47, 49);
3. Translocação microbiana (47, 49);
4. Co-infecções (oportunistas ou não) (47, 49);
5. Aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e pró-apoptóticas com estimulação de células imunitárias B e T não específicas para o VIH (47, 49);
6. Ativação aberrante de pDC (50);
7. Desregulação das células T reguladoras (Tregs) (47, 49);
8. Alteração do *ratio* de Tregs e Th17 (50).
9. Replicação de baixo nível persistente mesmo sob HAART (51);
10. Níveis muito elevados de apoptose de células epiteliais intestinais precoce (41).

3. Células Th17

Estas células são um subtipo de células T CD4⁺, muito importantes para a homeostasia intestinal (52), e entre as suas importantes funções estão:

- Envolvimento na regeneração epitelial e manutenção da barreira intestinal [Brand *et al.* (2006), citados por Hofer & Speck (2009)] – estimulam a

produção de defensinas e de mucina [Sugimoto *et al.* (2008), citados por Hofer e Speck (2009)], e induzem a expressão de claudinas [Kinugasa *et al.* (2000), citados por Hofer & Speck (2009)], que são os componentes das *tight junctions*, através da libertação de IL-17 e IL-22 (17);

- Papel crucial na elaboração de uma resposta rápida a microorganismos patogénicos, estimulando a produção de citocinas antimicrobianas e quimiocinas recrutadoras de neutrófilos, monócitos e linfócitos (53);
- Produção de IL-22 que aumenta a produção da LBP no fígado [Wolk *et al.* (2007), citados por Hofer & Speck (2009)].
- Associação com o aumento da resposta das mucosas à HAART (54).

Brenchley *et al.* (26) observaram uma depleção preferencial de células Th17 no intestino comparativamente às células Th1 (ambas são subtipos de células T CD4⁺), e comparativamente também a outras mucosas nos indivíduos infectados, e observaram que as células CD4⁺ no sangue são desviadas de um fenótipo Th17 para um fenótipo Th1 monofuncional. Chege *et al.* observaram que depleção de Th17 gastrintestinais se dava muito mais precocemente do que a nível periférico, e observaram uma correlação inversa entre LPS plasmático e números de Th17 intestinais (55). Alguns estudos (39, 56) propuseram que esta depleção prejudicasse a barreira gastrointestinal, o que, por sua vez, levaria à translocação microbiana que contribui para a AI. No entanto, nenhuma prova experimental definitiva ligou a disfunção das células Th17 e os níveis de LPS elevados. Por exemplo, um outro estudo (42) não encontrou correlação entre os níveis de LPS e o número de células Th17 em macacos infectados, mas Cecchinato *et al.* (42) demonstrou no modelo primata que os números de Th17 nas mucosas está negativamente correlacionado com a viremia.

Interessantemente, Hartigan-O'Connor *et al.* demonstraram que a replicação do VIS em macacos *rhesus* é limitada pelas dimensões do compartimento de células Th17 existente antes do momento da infecção – macacos com grandes números de Th17 periféricas e intestinais experimentaram viremias de pico e do *set point* cerca de um logaritmo mais baixas comparativamente àqueles com números mais baixos de Th17 (57).

4. Células T reguladoras e outras células do GALT

As Tregs são abundantes na mucosa intestinal e exercem funções anti-inflamatórias, controlando as células T auto-reactivas e os microorganismos intestinais (58). Macacos infectados e com altíssimas cargas virais apresentam um número maior de Tregs que animais com cargas virais baixas (59). Concordantemente, Nilsson *et al.* (60) demonstraram que o controlo imunitário da replicação viral está associado com baixos números de Tregs, enquanto replicação viral activa descontrolada está associada a elevados números destas células nos tecidos linfóides, podendo este aumento pode contribuir para uma resposta imunitária VIS-específica menos eficaz e assim para cargas virais aumentadas (já que exercem funções anti-inflamatórias). No entanto, um outro estudo mostrou que inibindo a função das Tregs com um anticorpo anti-CTLA-4 a replicação do VIS aumentava, particularmente em mucosas (61), sugerindo que as Tregs são protectoras através da redução da AI e da replicação viral.

O GALT contém muitos outros tipos de células imunitárias para além das já mencionadas e até agora pouco se sabe acerca da sua evolução na infecção crónica. Também se observou uma diminuição nas **células mielomonocíticas** (granulócitos, macrófagos e DCs) no GALT de indivíduos afectados pelo VIH, essenciais para a morte e fagocitose de microorganismos intestinais e para a organização de uma resposta imune adaptativa (26).

Outro estudo observou que os macacos *sooty mangabeys* (hospedeiro natural do VIS), que não apresentam elevações do LPS plasmático apesar da depleção de CD4⁺ do GALT, apresentam números incrivelmente elevados de células T $\gamma\delta$ (36), podendo estas estar envolvidas na diminuição da translocação microbiana. Também em humanos infectados por VIH os linfócitos T $\gamma\delta$ intraepiteliais duodenais se mostraram elevados (62). Estas células constroem uma interface entre as imunidades inata e adaptativa e são essenciais para a função imune das superfícies mucosas [Modlin *et al.* (2005), citados por Hofer & Speck (2009)]. Para além da produção de IL-17 e de INF- γ , têm importantes papéis no recrutamento de neutrófilos durante infecções bacterianas e na vigilância tumoral [Shibata *et al.* (2007), citados por Costiniuk (2012)]. As interacções entre células Th17, Tregs e T $\gamma\delta$ na infecção por VIH são muito complexas e ainda muito pouco compreendidos (63).

Algumas evidências sugerem que as células *natural killer* (NK) têm um importante papel no controlo da progressão da SIDA, no entanto, os

mecanismos e os locais para a sua acção ainda não são conhecidos (64). No intestino, estas células produzem citocinas pró-inflamatórias [Leon *et al.* (2003), citados por Sips *et al.* (2012)] e são muito importantes no controlo de algumas infecções entéricas [Carman *et al.* (1986), citados por Sips *et al.* (2012)] . O intestino contém dois subtipos distintos destas células - um intraepitelial, e o outro na LP (65), que se encontram reduzidos na infecção crónica, e em pacientes sob HAART com recuperação incompleta das células T CD4⁺ observou-se uma expansão muito significativa destes (65), interpretada como uma tentativa de compensação para a recuperação incompleta das células CD4⁺. Mela *et. al* (66) demonstraram pela primeira vez uma depleção paralela de células NK e CD4⁺ na LP colónica. Com supressão das viremias periféricas pela HAART, os indivíduos infectados pelo VIH viam os seus níveis de células NK aumentados (66).

5. Consequências da activação imune

Apesar da existência actual de uma HAART muito eficaz, os doentes VIH-positivos suprimidos têm ainda uma esperança média de vida encurtada no mínimo 10 anos comparada à da população geral e risco mais alto de desenvolver doenças comumente associadas ao envelhecimento, mas em idades muito mais precoces (neoplasias não relacionadas com o VIH, doença cardiovascular, hepática, renal, disfunção neurocognitiva e osteoporose) [Lewden *et al.* (2008), citados por Hunt (2010)]. Esta mortalidade antecipada e aumentada poderia ser explicada por factores de risco confundidores (drogas injectáveis e co-infecção pelo vírus da hepatite C, por exemplo), mas um estudo multinacional confirmou recentemente que pacientes infectados pelo VIH que iniciaram terapia HAART continuam a ter taxas de mortalidade mais elevadas a longo-termo que a população geral mesmo quando se restringia a amostra a pacientes que não usavam drogas injectáveis (67).

A AI é a marca principal da infecção por VIH-1 (68). Esta parece predizer fortemente muitos destes eventos não-SIDA e foi proposta como um dos factores mais importantes na restauração de saúde normal em indivíduos infectados (69). Elevações nos marcadores inflamatórios (como a IL-6 e o marcador de coagulação D-dímero) foram fortemente associados com todas as causas de mortalidade e eventos cardiovasculares em indivíduos tratados (69-

71). Trabalhos recentes sugerem um *link* entre translocação microbiana e doença cardiovascular em indivíduos infectados pelo VIH, estando a primeira correlacionada com a expressão do factor tecidular (também conhecido como tromboplastina) à superfície dos monócitos em doentes tratados e não tratados, que activa a cascata da coagulação e contribui para a formação de trombos, aumentando o risco de doenças vasculares trombóticas (72). Para além de tudo isto, a AI crónica é enorme preditor da progressão da doença (30), ainda mais do que a carga viral (36, 43), e um determinante *major* da depleção de CD4⁺ [Deeks *et al.* (2004), citados por Marchetti *et al.* (2011)]. Curioso é observar que esta AI crónica e generalizada não se observa nas infecções não-patogénicas pelo VIS nos seus hospedeiros naturais, que não progridem para a SIDA, apesar das altas cargas virais existentes (73).

Um estudo recente de Canary *et al.* (43) em primatas enfatizou também a importância dos níveis de AI pré-infecção, uma vez que níveis baixos de AI na altura da infecção estariam associados a baixos números CD4⁺ activados, e colocaram a hipótese que este fosse um dos factores causais para uma baixa viremia nos LTNP, que teriam anteriormente à infecção níveis mais baixos de AI, mostrando uma relação directa entre estes níveis de translocação microbiana pré-infecção e progressão da doença.

D. A fibrose no GALT

A inflamação intestinal tem também efeitos negativos na arquitectura tecidular global do GALT (para além dos efeitos na barreira epitelial), que desenvolve uma fibrose marcada (23).

Estes *et al.* (23) estudaram a deposição de colagénio como um mecanismo para a depleção de CD4⁺ no GALT que limita a reconstituição destas células durante a HAART e compararam esta deposição e a extensão da depleção e reconstituição dos CD4⁺ no sangue periférico, LNs, e locais indutivos e efectores no GALT. Já tinha sido previamente demonstrado que a AI resulta em fibrose nos LN e disrupção da arquitectura do tecido linfóide, o que contribui para a depleção de CD4⁺ antes do tratamento e afeta a extensão da reconstituição imune após este (74, 75). O ponto de maior importância neste estudo é a observação de deposição de colagénio precoce e extensa no GALT, muito superior ao observado em outros tecidos linfóides, o que

correlacionaram com maior depleção e reconstituição limitada das células CD4⁺ a este nível.

Este processo de deposição de colagénio pode ser iniciado pela libertação na infecção aguda de TGF- β 1 pelas Tregs (76), e persiste mesmo durante a HAART [Schacker *et al.* (2002), citados por Hatano (2013)]. A fibrose leva a uma perda da rede das células reticuladas fibroblásticas que providenciam a infraestrutura mecânica que permite a homeostasia das células T, e o acesso diminuído destas aos sinais homeostáticos resultaria em apoptose aumentada como um mecanismo para depleção de células T associada com fibrose (77).

IX. Alteração na expressão de genes na mucosa intestinal

Sankaran *et al.* (7, 78) encontraram um significativo aumento na expressão de genes reguladores da AI, tráfico de células e resposta inflamatória na mucosa intestinal de doentes com altas cargas virais em comparação aos LTNP. O mesmo foi observado por Guadalupe *et al.* (15) em doentes sob HAART com pobre reconstituição de células CD4⁺. Genes associados com a regulação do ciclo celular, metabolismo lipídico e de carboidratos e funções da barreira epitelial celular e digestivas foram regulados negativamente em doentes com altas cargas virais e nos LTNP, o que pode influenciar adversamente as funções absorptivas e digestivas em ambos os grupos (78). Genes relacionados com apoptose e necrose também foram sobreexpressados no GALT (75). Múltiplos membros da família do Cyt P450 estão regulados negativamente, quer em doentes com altas viremias, quer em LTNP, indicando que o metabolismo e eficácia de muitos fármacos anti-retrovirais podem estar substancialmente comprometidos (78). Assim, a mucosa intestinal permanece um alvo do VIH-1 em LTNP apesar da supressão das cargas virais e da manutenção das funções imunes [Valdez *et al.* (2002), citados por Sankaran *et al.* (2005)]. Guadalupe *et al.* (15) observaram também que a expressão de genes envolvidos no crescimento e reparação estavam aumentados em doentes com restauração de CD4⁺ eficaz.

Canani *et al.* observaram que a proteína do VIH Tat causou uma diminuição de *uptake* de glucose por alterações na expressão e actividade do importador Na-D-Glucose (SGLT-1) (79). Encontraram também um padrão de repressão de múltiplos factores de crescimento e observaram a diminuição da expressão do receptor da IL-7 (necessária para a manutenção de populações de células T *naïves* e de memória). Na infecção crónica, um ambiente pró-inflamatório marcado por *upregulation* da IL-6 e da STAT3 persiste (80), e a IL-2, IL-4 e TNF- α estão aumentados, o que causa um aumento da permeabilidade epitelial (34).

X. O GALT como santuário farmacológico

A HAART permite que se consigam níveis de RNA viral indetectáveis por ensaios convencionais na grande maioria dos indivíduos sob esta terapêutica [Verhofstede *et al.* (2010), citados por Cory *et al.* (2013)]. Apesar do excelente controlo da replicação viral e da manutenção de contagens de T CD4⁺ com a HAART que permitem ao doente ter uma longevidade muito próxima do normal [Mills *et al.* (2011), citados por Eisele & Siliciano (2012)], nem uma cura esterilizante, nem funcional, conseguiram ser atingidas com a HAART [Lewin *et al.* (2011), citados por Cory *et al.* (2013)]. Um mecanismo que poderá impedir a *clearance* completa dos reservatórios virais, é que as concentrações dos agentes da HAART não sejam suficientes para suprimir completamente a replicação viral em todos os reservatórios, e estas concentrações variem entre diferentes partes do organismo (11).

O GALT e o RALT são os locais onde se dá maior replicação viral em pacientes não suprimidos e funcionam como um santuário para o VIH-1. Chun *et al.* (12) e Yukl *et al.* (14) observaram que mesmo após muitos anos de HAART, continua a isolar-se o vírus destes locais, e sugerem que aqui existam células T latentemente infectadas que incluam um reservatório viral muito importante. Ambos observaram também no GALT níveis de DNA pró-viral (normalizado para as contagens de CD4⁺) significativamente mais elevados do que no sangue. Yukl *et al.* (14) estimaram que mesmo após muitos anos de HAART, 83 a mais de 95% das células T infectadas no organismo se localizem no intestino.

Van Marle *et al.* fizeram uma observação interessante, demonstrando que as quasi-espécies virais variavam em diferentes partes do tracto gastrointestinal, indicando que a replicação do VIH-1 no intestino é compartimentalizada, sofrendo diferentes pressões evolutivas em diferentes zonas do intestino (81). Uma explicação farmacológica é que a expressão de enzimas metabolizadoras de fármacos não é uniforme ao longo do trato GI, o que origina diferenças regionais nas concentrações de anti-retrovíricos (11). Por exemplo, há diferenças consideráveis na expressão de transportadores como o BCRP, proteína resistente a múltiplos fármacos 2 (MRP 2) e glicoproteína-P (Pgp) entre pacientes e entre diferentes secções do intestino (82). Também se observaram variações consideráveis na expressão das

enzimas do citocromo (CYP) P450, sendo que a maioria da expressão do CYP ocorre na secção proximal do intestino [Paine *et al.* (2006), citados por Cory *et al.* (2013)].

XI. Efeito da terapia HAART na reconstituição do GALT

A bibliografia referente a se as células T CD4⁺ da mucosa podem ser restauradas pela HAART eficaz é contraditória. Depleção de células T CD4⁺ e AI persistentes são notadas no GALT na maioria dos pacientes apesar de até 5 anos de HAART supressiva (8, 28), contrariamente ao que acontece no sangue periférico, sendo o GALT um reservatório persistente de vírus (12, 13, 24). Chun *et al.* (12) observaram que após uma média de 8,4 anos de HAART efectiva, as células T CD4⁺ representavam cerca de 11,3% dos linfócitos do GALT [em contraste com os 40% em indivíduos não infectados (8, 18)], e após 9,9 anos ainda se observava aqui recuperação incompleta dos CD4⁺. Vários outros estudos demonstraram uma reconstituição das células T CD4⁺ no intestino incompleta sob HAART longa duração (5, 28). No entanto, em alguns estudos, uma recuperação de células T CD4⁺ significativa consegue ser atingida.

Guadalupe *et al.* (10) observaram que a iniciação da HAART na infecção aguda resultou em restauração quase completa das células CD4⁺ intestinais, apesar do atraso comparativamente àquelas periféricas. George *et al.* (83) observaram no modelo primata a supressão das cargas virais e reconstituição das células CD4⁺ no GALT com a HAART iniciada na infecção aguda, sendo esta associada à *upregulation* de factores de crescimento e genes envolvidos na regeneração do epitélio intestinal. Num estudo de Macal *et al.*, após uma HAART de longa duração (5 a 18 anos), seis dos indivíduos obtiveram uma subida das percentagens de CD4⁺ para mais de metade do observado em controlos não-infectados, o que foi associado com acumulação de células Th17 e respostas celulares anti-VIH polifuncionais, apesar do reservatório pró-viral das células CD4⁺ e AI persistentes, e concluíram também que a reconstituição de CD4⁺ não necessita de ser completa para que se observem melhoras substanciais na função destas células (54). Sheth *et al.*, iniciando a HAART uma média de 28 meses depois do diagnóstico, conseguiram uma percentagem de células CD4⁺ no cólon sigmóide (56%) que não diferiu significativamente daquela dos controlos não infectados (84). Apesar da terapêutica não ter sido iniciada na infecção aguda, os autores defendem que a reconstituição completa possa ser possível se esta for iniciada suficientemente cedo no decurso da infeção (84).

Os estudos iniciais que examinaram os efeitos da HAART na imunidade gastrointestinal foram realizados maioritariamente durante a infecção crónica. A maioria destes estudos de pacientes tratados durante a infecção crónica demonstraram que níveis persistentemente aumentados de marcadores inflamatórios pós-HAART comparativamente a controlos não-infectados (55, 85, 86). Está a tornar-se evidente que as intervenções com maior sucesso para bloquear a transmissão do VIH e a progressão da doença terão de realizar-se durante a fase aguda da infecção (58). Mais recentemente, tem sido dada mais ênfase ao estudo da reconstituição do GALT com a HAART iniciada durante a infecção aguda, como uma tentativa de parar e reverter o dano ao GALT antes que este se torne irreparável (5). A disrupção do GALT foi associada com a progressão da doença (45) e assim, se se conseguisse reverter esta disrupção talvez se estivesse mais próximo da cura. Um estudo recente em que a iniciação da HAART se deu durante a infecção aguda demonstrou IA reduzida a normal após 48 semanas do início da terapêutica (87), e Chege *et al.* (55) demonstraram que iniciando a HAART com CD4⁺ superiores a 350 células / μ L foi associado com restauração aumentada dos Th17.

No entanto, a maioria dos estudos que examinaram a reconstituição de células CD4⁺ do GALT com a HAART instituída nesta fase também parecem demonstrar reconstituição imune parcial (8, 28). Sankaran *et al.* observaram que pacientes com melhor supressão viral no GALT durante a infecção aguda exibem maior *upregulation* de factores e mucinas que protegem e mantêm a barreira epitelial, fenótipo também observado em pacientes LTNP mas não naqueles com infecções por VIH crónicas e progressivas (7).

Evering *et al.* (88) colocaram a hipótese de que a replicação contínua local no GALT apesar da HAART supressiva pudesse ser uma das causas de AI e depleção persistente de CD4⁺ a nível gastrintestinal; no entanto, num grupo de indivíduos que iniciou a HAART durante a infecção aguda não se observou nenhuma replicação do VIH-1 *de novo*. Por outro lado, Chege *et al.* (55) observou permanência do reservatório pró-viral a nível do cólon apesar de HAART de longa duração, o que associou com a translocação microbiana persistente e restauração incompleta das células Th17. De qualquer das formas, mesmo após prolongada supressão viral, persistem alterações significativas no GALT, como a fibrose irreversível já mencionada (23), e AI continuada (85, 89).

Vários grupos de investigação observaram que a HAART diminui os níveis de LPS plasmático (24, 36, 40, 90), mas Brenchley *et al.* (36) e Jiang *et al.* (40) observaram que não que a terapêutica não suprimiu completamente, mas apenas parcialmente, a translocação microbiana. Marchetti *et al.* (38) observaram que todos os pacientes sob HAART apresentavam níveis séricos mais baixos de LPS relativamente aos controlos não-tratados. O sucesso da terapêutica (aumento das contagens de CD4⁺) foi associado com níveis de LPS ainda mais baixos. Isto significa que mesmo com cargas virais suprimidas, níveis baixos de translocação microbiana ainda ocorrem e parecem estar associados com contagens de CD4⁺ mais baixas (38), o que está de acordo com Brenchley *et al.* (36).

Por outro lado, Merlini *et al.* (91), de forma semelhante, descreveram que a HAART iniciada em pacientes já com uma depleção de CD4⁺ severa não induziu melhorias na translocação microbiana, o que correlacionaram com o dano estrutural dramático já existente na barreira em infecções avançadas.

Epple *et al.* (34) investigaram a função da barreira comparando biópsias duodenais de indivíduos infectados pelo VIH-1 sob HAART supressiva VS infectados não tratados VS controlos não infectados, e associaram a HAART com a normalização de alguns defeitos epiteliais, tanto que os doentes tratados com HAART não demonstraram alterações da barreira relativamente aos controlos VIH-negativos. Concluíram desta forma que a HAART supressiva reverte o defeito da barreira e a atrofia vilosa. Assim, talvez seja possível a restauração da barreira mucosa intestinal em pacientes sob HAART supressiva apesar da persistência de anormalidades funcionais e estruturais do sistema imune mucoso. Foi demonstrado que a reconstituição imune com a HAART ocorre em maior grau no GALT em locais indutivos que em locais efetores (28).

Na infecção pelo VIS em macacos, a melhor reconstituição de células CD4⁺ de memória ocorre se a terapia for iniciada em estágios iniciais de infecção [Letvin *et al.* (2006), Mattapallil *et al.* (2006), Picker *et al.* (2004), citados por Estes *et al.* (2008)]. Estes *et al.* (23) confirmam que a HAART iniciada em estágios mais posteriores da infecção por VIH-1 não resulta na reconstituição do intestino, mas que a reconstituição de subpopulações das células CD4⁺ do intestino é possível com tratamento precoce (23), assim como uma maior reconstituição desta população também no sangue periférico e nos outros tecidos linfóides periféricos (23). Os benefícios do tratamento precoce para a reconstituição imune, especialmente no GALT, sugerem que as recentes

recomendações para esperar que a contagem dos CD4⁺ desça para 350 células/mm³ antes da iniciação da HAART pode não ser óptima para a restauração da imunidade provada necessária para a imunovigilância contra tumores e patogéneos.

A HAART na infecção crónica tem sido associada com níveis reduzidos de T CD8⁺, na mucosa gastrointestinal, que apresentam respostas atenuadas aos antígenos do VIH [Critchfield *et al.* (2007), citados por Cistiniuk *et al.* (2012)]. Na infecção aguda, níveis mais baixos de T CD8⁺ de memória no trato gastrointestinal correlacionaram-se com melhor reconstituição de células T CD4⁺ no GALT seguidamente à iniciação de HAART (28). A HAART também mostrou aumentar apenas parcialmente as contagens de NK intestinais (66), e de diminuir as células $\gamma\delta$, mas não até níveis observados em não-infectados (62).

XII. Intervenções terapêuticas potenciais

A. Intervenções terapêuticas potenciais para diminuir a AI

A AI é provavelmente um grande factor causal quer no estabelecimento inicial quer na manutenção subsequente de um reservatório viral, sendo assim uma barreira potencial às estratégias de cura atuais (92), e é um preditor independente de mortalidade na infecção por VIH (70).

No contexto de uma HAART supressiva, Hatano *et al.* (93) concluíram que indivíduos com níveis inferiores de AI e respostas mucosas imunitárias específicas para o VIH mais fortes (94) apresentam níveis mais baixos de reservatório latente. Sankaran *et al.* (7) defendem que um aumento precoce e sustentado na reparação e regeneração intestinal epitelial pode ser necessário para eficazmente suprimir a enteropatia associada ao VIH e, por extensão, a progressão da doença. Assim, colocar como alvo terapêutico a AI induzida pelo VIH é uma estratégia terapêutica já considerada e ainda posta em questão, em adição à HAART, como gestão clínica da infecção. Já vários estudos foram realizados e outros estão no momento em desenvolvimento como uma tentativa de encontrar agentes capazes de diminuir a AI que tantos efeitos deletérios apresenta. Consultar quadros 1 e 2 em Anexo para detalhes.

B. Intervenções terapêuticas potenciais para restaurar as células Th17 do GALT ou a sua função

A perda precoce e maciça de células Th17 do GALT durante infecções VIS e VIH patogénicas é provavelmente um determinante chave para a translocação microbiana (26, 39, 95), e assim, estratégias para a restauração de células Th17 do GALT ou a sua função podem apresentar alguma promessa.

Chege *et al.* concluíram que a iniciação da HAART com uma contagem de CD4⁺ periféricos superior a 350 células/ μ L, em vez de a iniciar com contagens inferiores a esta, está associado com uma maior restauração das células Th17 sigmoideias (55). Dado a relação recíproca entre as células Th17 e as células Tregs (as células Th17 diminuem precocemente associado a um

aumento das Tregs), foi sugerido que o equilíbrio entre estas pode, de facto, ser mais importante do que os níveis absolutos de cada uma delas independentemente, para a progressão da doença (39, 63).

Dado que as células Th17 e as células Tregs partilham um mesmo progenitor, o microambiente inflamatório intestinal pode resultar no desvio dos progenitores pela via das Tregs (anti-inflamatórias), e assim, intervenções para diminuição da inflamação directamente pode permitir melhor reconstituição das células Th17 permitindo que os progenitores se diferenciem em Th17 (96).

C. Potenciais intervenções para diminuir a fibrose no GALT

O recurso a fármacos antifibróticos pode ter um papel como terapia adjuvante no tratamento da infecção por VIH-1, quer na limitação da depleção quer no aumento da reconstituição durante a HAART.

Estão neste momento a ser desenvolvidos um vários estudos com administração de potenciais fármacos anti-fibróticos (ClinicalTrials.gov NCT01535235 e ACTG 5317). Para detalhes consultar quadro 3 em Anexos (76).

D. Intervenções terapêuticas potenciais para ultrapassar o santuário farmacológico e o reservatório no GALT

Novos fármacos ou novas formas de distribuição que permitissem o alcance de concentrações de fármacos nos tecidos linfóides que suprimissem completamente a replicação viral talvez tornassem possível a erradicação dos reservatórios e santuários. A revisão extensa desta literatura ultrapassa os objectivos desta dissertação, e assim o autor faz apenas uma pequena síntese.

Um conceito terapêutico interessante é a combinação da HAART com fármacos capazes de reactivar a replicação viral em CD4⁺ latentes de forma a reduzir o reservatório (47). No entanto, o número de fármacos que pode ser utilizado com segurança para reactivação viral é muito restrito, assim como o é

o conhecimento dos factores necessários para a reactivação do vírus latente [Bosque *et al.* (2009), citados por d’Ettoire *et al* (2011)].

A administração local de anti-retrovíricos nos santuários pode teoricamente ser testada nesta infecção (11). Outra hipótese seria a administração de fármacos bloqueadores das bombas de influxo e de efluxo e das enzimas metabolizadoras dos anti-retrovíricos (11). Está também em desenvolvimento a utilização de fármacos anti-retrovíricos em nano-escala (formulados em partículas com dimensões inferiores 100 nm) para aumentar as concentrações destes em santuários (97-99). A modificação da estrutura química dos fármacos anti-retrovíricos existentes e o desenvolvimento de novos fármacos com melhores propriedades de distribuição para os santuários é outra abordagem (11).

XIII. Conclusões

Desde o momento em que se isolou, pela primeira vez em 1983, o VIH de um doente com linfadenopatia e se comprovou que este era o agente etiológico da SIDA (1), que a explosão de investigação, novas descobertas sobre a virologia, patogenia imunológica e virológica, tratamento da infecção e doenças oportunistas e desenvolvimento de vacinas não sofreu qualquer paragem ou abrandamento. A cada nova descoberta abrem-se novas portas para toda uma nova investigação.

Os efeitos patogénicos do VIH no GALT neste artigo revistos [como depleção precoce de células CD4⁺ (7, 8), acumulação de células CD8⁺ (26, 27), desregulação das células B (31) e do equilíbrio entre as células Th17, Tregs e T $\gamma\delta$ (55, 62), diminuição das células NK (64, 65) (66) e fibrose (23, 76)] mostraram ser importantíssimos na evolução da infecção, determinando uma disfunção na barreira intestinal que permite um AI intensíssima e persistente que coloca as células do nosso sistema imunitário à disposição do vírus para a sua infecção e morte (33, 34). O sucesso da terapêutica HAART no aumento da longevidade dos doentes infectados ainda deixa muito a desejar no que toca à melhoria da sua qualidade de vida. A AI crónica está associada a muitas patologias não associadas com a SIDA (neoplasias não relacionadas com o VIH, doença cardiovascular, hepática, renal, disfunção neurocognitiva e osteoporose) (67), que ocorrem muito mais cedo do que em doentes não-infectados, sendo esta AI um melhor preditor da progressão da doença relativamente à carga viral e às contagens de CD4⁺. Tendo também em conta que, tal como outros órgãos como o sistema nervoso central, o intestino funciona como um reservatório (12) e um santuário (11) para o vírus, impedindo a completa erradicação do vírus com os actuais agentes terapêuticos da HAART existentes, é incontestável a importância do estudo deste órgão na investigação de novas estratégias terapêuticas.

A extensa literatura existente sobre o papel do intestino e do GALT na infecção pelo VIH ainda não deu resposta a muitas questões. São necessários mais estudos para pesquisa das causas desta depleção preferencial de CD4⁺ no intestino e os mecanismos que fazem deste um excelente reservatório e santuário para o VIH, para clarificar o efeito da HAART nas contagens de CD4⁺ e da replicação viral no GALT e na reconstituição da barreira epitelial, já que a

bibliografia aqui é contraditória. É também necessário esclarecer os mecanismos de interacção entre as células Th17, Tregs e T $\gamma\delta$, de forma a fornecer aos investigadores o *insight* necessário para o desenvolvimento de técnicas que permitam o restabelecimento do equilíbrio intestinal destas células. Deve também ser repensado o momento da introdução da HAART relativamente às contagens de CD4⁺, uma vez que as evidências apontam para mais benefícios quer a nível da restauração imune no GALT quer a nível da diminuição da AI se esta for introduzida precocemente na evolução da infecção, e não esperar até que as contagens de CD4⁺ desçam para valores inferiores a 350 células/mm³ (10, 55, 58, 83, 84). A investigação de agentes potenciais diminuidores da activação imune é de importância *major* na melhoria do quadro clínico, do prognóstico e da mortalidade dos doentes VIH positivos, assim como a investigação de agentes anti-fibróticos e de abordagens terapêuticas destinadas à ultrapassagem dos reservatórios e santuários virais.

XIV. Bibliografia – Referências

1. Fauci AS, Clifford Lane H. Human Immunodeficiency Virus Disease: AIDS and Related Disorders. In: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J, editors. Harrison's principles of Internal Medicine. 18th ed: McGraw Hill Professional; 2011. p. 1506-7.
2. Das A, Xu H, Wang X, Yau CL, Veazey RS, Pahar B. Double-positive CD21+CD27+ B cells are highly proliferating memory cells and their distribution differs in mucosal and peripheral tissues. PLoS One. 2011;6(1):e16524.
3. Moir S, Chun TW, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of HIV disease. Annu Rev Pathol. 2011;6:223-48.
4. Eisele E, Siliciano RF. Redefining the viral reservoirs that prevent HIV-1 eradication. Immunity. 2012;37(3):377-88.
5. Costiniuk CT, Angel JB. Human immunodeficiency virus and the gastrointestinal immune system: does highly active antiretroviral therapy restore gut immunity? Mucosal Immunol. 2012;5(6):596-604.
6. Vega-López MA, Cole MF, Bellanti JA. The Mucosal Immune System in Health and Disease. In: Bellanti JA, editor. Immunology IV Clinical Applications in Health and Disease. 4th ed. Bethesda, Maryland 20816: I Care, Inc; 2012. p. 255-70.
7. Sankaran S, George MD, Reay E, Guadalupe M, Flamm J, Prindiville T, et al. Rapid onset of intestinal epithelial barrier dysfunction in primary human immunodeficiency virus infection is driven by an imbalance between immune response and mucosal repair and regeneration. J Virol. 2008;82(1):538-45.
8. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. J Exp Med. 2004;200(6):761-70.
9. Gori A, Tincati C, Rizzardini G, Torti C, Quirino T, Haarman M, et al. Early impairment of gut function and gut flora supporting a role for alteration of gastrointestinal mucosa in human immunodeficiency virus pathogenesis. J Clin Microbiol. 2008;46(2):757-8.
10. Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, et al. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. J Virol. 2003;77(21):11708-17.
11. Cory TJ, Schacker TW, Stevenson M, Fletcher CV. Overcoming pharmacologic sanctuaries. Curr Opin HIV AIDS. 2013;8(3):190-5.

12. Chun TW, Nickle DC, Justement JS, Meyers JH, Roby G, Hallahan CW, et al. Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2008;197(5):714-20.
13. Poles MA, Boscardin WJ, Elliott J, Taing P, Fuerst MM, McGowan I, et al. Lack of decay of HIV-1 in gut-associated lymphoid tissue reservoirs in maximally suppressed individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006;43(1):65-8.
14. Yukl SA, Gianella S, Sinclair E, Epling L, Li Q, Duan L, et al. Differences in HIV burden and immune activation within the gut of HIV-positive patients receiving suppressive antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2010;202(10):1553-61.
15. Guadalupe M, Sankaran S, George MD, Reay E, Verhoeven D, Shacklett BL, et al. Viral suppression and immune restoration in the gastrointestinal mucosa of human immunodeficiency virus type 1-infected patients initiating therapy during primary or chronic infection. *J Virol.* 2006;80(16):8236-47.
16. Cheroutre H, Madakamutil L. Acquired and natural memory T cells join forces at the mucosal front line. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(4):290-300.
17. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485-517.
18. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med.* 2004;200(6):749-59.
19. Douek DC, Picker LJ, Koup RA. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:265-304.
20. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Manuelli V, Jean-Pierre P, Lopez P, et al. Mechanisms of gastrointestinal CD4+ T-cell depletion during acute and early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 2007;81(2):599-612.
21. Li Q, Duan L, Estes JD, Ma ZM, Rourke T, Wang Y, et al. Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature.* 2005;434(7037):1148-52.
22. Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature.* 2005;434(7037):1093-7.
23. Estes J, Baker JV, Brenchley JM, Khoruts A, Barthold JL, Bantle A, et al. Collagen deposition limits immune reconstitution in the gut. *J Infect Dis.* 2008;198(4):456-64.
24. Brenchley JM, Price DA, Douek DC. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol.* 2006;7(3):235-9.

25. Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, Shvetz DE, Pauley DR, Knight HL, et al. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science*. 1998;280(5362):427-31.
26. Brenchley JM, Paiardini M, Knox KS, Asher AI, Cervasi B, Asher TE, et al. Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood*. 2008;112(7):2826-35.
27. Epple HJ, Allers K, Tröger H, Kühl A, Erben U, Fromm M, et al. Acute HIV infection induces mucosal infiltration with CD4+ and CD8+ T cells, epithelial apoptosis, and a mucosal barrier defect. *Gastroenterology*. 2010;139(4):1289-300.
28. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Jean-Pierre P, Manuelli V, Lopez P, et al. Lack of mucosal immune reconstitution during prolonged treatment of acute and early HIV-1 infection. *PLoS Med*. 2006;3(12):e484.
29. Gordon SN, Klatt NR, Bosinger SE, Brenchley JM, Milush JM, Engram JC, et al. Severe depletion of mucosal CD4+ T cells in AIDS-free simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *J Immunol*. 2007;179(5):3026-34.
30. Pandrea IV, Gautam R, Ribeiro RM, Brenchley JM, Butler IF, Pattison M, et al. Acute loss of intestinal CD4+ T cells is not predictive of simian immunodeficiency virus virulence. *J Immunol*. 2007;179(5):3035-46.
31. Levesque MC, Moody MA, Hwang KK, Marshall DJ, Whitesides JF, Amos JD, et al. Polyclonal B cell differentiation and loss of gastrointestinal tract germinal centers in the earliest stages of HIV-1 infection. *PLoS Med*. 2009;6(7):e1000107.
32. Das A, Veazey RS, Wang X, Lackner AA, Xu H, Pahar B. Simian immunodeficiency virus infection in rhesus macaques induces selective tissue specific B cell defects in double positive CD21+CD27+ memory B cells. *Clin Immunol*. 2011;140(3):223-8.
33. Estes JD, Harris LD, Klatt NR, Tabb B, Pittaluga S, Paiardini M, et al. Damaged intestinal epithelial integrity linked to microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections. *PLoS Pathog*. 2010;6(8):e1001052.
34. Epple HJ, Schneider T, Troeger H, Kunkel D, Allers K, Moos V, et al. Impairment of the intestinal barrier is evident in untreated but absent in suppressively treated HIV-infected patients. *Gut*. 2009;58(2):220-7.
35. Epple HJ, Zeitz M. HIV infection and the intestinal mucosal barrier. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1258:19-24.
36. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*. 2006;12(12):1365-71.

37. Hunt PW, Brenchley J, Sinclair E, McCune JM, Roland M, Page-Shafer K, et al. Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J Infect Dis.* 2008;197(1):126-33.
38. Marchetti G, Bellistri GM, Borghi E, Tincati C, Ferramosca S, La Francesca M, et al. Microbial translocation is associated with sustained failure in CD4+ T-cell reconstitution in HIV-infected patients on long-term highly active antiretroviral therapy. *AIDS.* 2008;22(15):2035-8.
39. Favre D, Lederer S, Kanwar B, Ma ZM, Proll S, Kasakow Z, et al. Critical loss of the balance between Th17 and T regulatory cell populations in pathogenic SIV infection. *PLoS Pathog.* 2009;5(2):e1000295.
40. Jiang W, Lederman MM, Hunt P, Sieg SF, Haley K, Rodriguez B, et al. Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. *J Infect Dis.* 2009;199(8):1177-85.
41. Li Q, Estes JD, Duan L, Jessurun J, Pambuccian S, Forster C, et al. Simian immunodeficiency virus-induced intestinal cell apoptosis is the underlying mechanism of the regenerative enteropathy of early infection. *J Infect Dis.* 2008;197(3):420-9.
42. Cecchinato V, Trindade CJ, Laurence A, Heraud JM, Brenchley JM, Ferrari MG, et al. Altered balance between Th17 and Th1 cells at mucosal sites predicts AIDS progression in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *Mucosal Immunol.* 2008;1(4):279-88.
43. Canary LA, Vinton CL, Morcock DR, Pierce JB, Estes JD, Brenchley JM, et al. Rate of AIDS progression is associated with gastrointestinal dysfunction in simian immunodeficiency virus-infected pigtail macaques. *J Immunol.* 2013;190(6):2959-65.
44. Papasavvas E, Pistilli M, Reynolds G, Bucki R, Azzoni L, Chehimi J, et al. Delayed loss of control of plasma lipopolysaccharide levels after therapy interruption in chronically HIV-1-infected patients. *AIDS.* 2009;23(3):369-75.
45. Hofer U, Speck RF. Disturbance of the gut-associated lymphoid tissue is associated with disease progression in chronic HIV infection. *Semin Immunopathol.* 2009;31(2):257-66.
46. Bourgeois C, Hao Z, Rajewsky K, Potocnik AJ, Stockinger B. Ablation of thymic export causes accelerated decay of naive CD4 T cells in the periphery because of activation by environmental antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(25):8691-6.
47. d'Ettorre G, Paiardini M, Ceccarelli G, Silvestri G, Vullo V. HIV-associated immune activation: from bench to bedside. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011;27(4):355-64.
48. Nilsson J, Kinloch-de-Loes S, Granath A, Sönnernborg A, Goh LE, Andersson J. Early immune activation in gut-associated and peripheral lymphoid tissue during acute HIV infection. *AIDS.* 2007;21(5):565-74.

49. Sodora DL, Silvestri G. Immune activation and AIDS pathogenesis. *AIDS*. 2008;22(4):439-46.
50. Rajasuriar R, Khoury G, Kamarulzaman A, French MA, Cameron PU, Lewin SR. Persistent immune activation in chronic HIV infection: do any interventions work? *AIDS*. 2013.
51. Mavigner M, Delobel P, Cazabat M, Dubois M, L'faqihi-Olive FE, Raymond S, et al. HIV-1 residual viremia correlates with persistent T-cell activation in poor immunological responders to combination antiretroviral therapy. *PLoS One*. 2009;4(10):e7658.
52. Maloy KJ, Kullberg MC. IL-23 and Th17 cytokines in intestinal homeostasis. *Mucosal Immunol*. 2008;1(5):339-49.
53. Dandekar S, George MD, Bäumlér AJ. Th17 cells, HIV and the gut mucosal barrier. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;5(2):173-8.
54. Macal M, Sankaran S, Chun TW, Reay E, Flamm J, Prindiville TJ, et al. Effective CD4+ T-cell restoration in gut-associated lymphoid tissue of HIV-infected patients is associated with enhanced Th17 cells and polyfunctional HIV-specific T-cell responses. *Mucosal Immunol*. 2008;1(6):475-88.
55. Chege D, Sheth PM, Kain T, Kim CJ, Kovacs C, Loutfy M, et al. Sigmoid Th17 populations, the HIV latent reservoir, and microbial translocation in men on long-term antiretroviral therapy. *AIDS*. 2011;25(6):741-9.
56. Raffatellu M, Santos RL, Verhoeven DE, George MD, Wilson RP, Winter SE, et al. Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes *Salmonella* dissemination from the gut. *Nat Med*. 2008;14(4):421-8.
57. Hartigan-O'Connor DJ, Abel K, Van Rompay KK, Kanwar B, McCune JM. SIV replication in the infected rhesus macaque is limited by the size of the preexisting TH17 cell compartment. *Sci Transl Med*. 2012;4(136):136ra69.
58. Siewe B, Landay A. Key Concepts in the Early Immunology of HIV-1 Infection. *Curr Infect Dis Rep*. 2012;14(1):102-9.
59. Boasso A, Vaccari M, Hryniewicz A, Fuchs D, Nacsa J, Cecchinato V, et al. Regulatory T-cell markers, indoleamine 2,3-dioxygenase, and virus levels in spleen and gut during progressive simian immunodeficiency virus infection. *J Virol*. 2007;81(21):11593-603.
60. Nilsson J, Boasso A, Velilla PA, Zhang R, Vaccari M, Franchini G, et al. HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. *Blood*. 2006;108(12):3808-17.
61. Cecchinato V, Trynieszewska E, Ma ZM, Vaccari M, Boasso A, Tsai WP, et al. Immune activation driven by CTLA-4 blockade augments viral replication at mucosal sites in simian immunodeficiency virus infection. *J Immunol*. 2008;180(8):5439-47.

62. Nilssen DE, Brandtzaeg P. Intraepithelial $\gamma\delta$ T cells remain increased in the duodenum of AIDS patients despite antiretroviral treatment. *PLoS One*. 2012;7(1):e29066.
63. Kanwar B, Favre D, McCune JM. Th17 and regulatory T cells: implications for AIDS pathogenesis. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;5(2):151-7.
64. Berger CT, Alter G. Natural killer cells in spontaneous control of HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS*. 2011;6(3):208-13.
65. Sips M, Sciaranghella G, Diefenbach T, Dugast AS, Berger CT, Liu Q, et al. Altered distribution of mucosal NK cells during HIV infection. *Mucosal Immunol*. 2012;5(1):30-40.
66. Mela CM, Steel A, Lindsay J, Gazzard BG, Gotch FM, Goodier MR. Depletion of natural killer cells in the colonic lamina propria of viraemic HIV-1-infected individuals. *AIDS*. 2007;21(16):2177-82.
67. Bhaskaran K, Hamouda O, Sannes M, Boufassa F, Johnson AM, Lambert PC, et al. Changes in the risk of death after HIV seroconversion compared with mortality in the general population. *JAMA*. 2008;300(1):51-9.
68. Estes JD. Enhancing immune responses to limit chronic immune activation during SIV. *J Clin Invest*. 2012;122(5):1611-4.
69. Kuller LH, Tracy R, Bellosso W, De Wit S, Drummond F, Lane HC, et al. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS Med*. 2008;5(10):e203.
70. Sandler NG, Wand H, Roque A, Law M, Nason MC, Nixon DE, et al. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *J Infect Dis*. 2011;203(6):780-90.
71. Gori A, Rizzardini G, Van't Land B, Amor KB, van Schaik J, Torti C, et al. Specific prebiotics modulate gut microbiota and immune activation in HAART-naïve HIV-infected adults: results of the "COPA" pilot randomized trial. *Mucosal Immunol*. 2011;4(5):554-63.
72. Funderburg NT, Mayne E, Sieg SF, Asaad R, Jiang W, Kalinowska M, et al. Increased tissue factor expression on circulating monocytes in chronic HIV infection: relationship to in vivo coagulation and immune activation. *Blood*. 2010;115(2):161-7.
73. Sumpter B, Dunham R, Gordon S, Engram J, Hennessy M, Kinter A, et al. Correlates of preserved CD4(+) T cell homeostasis during natural, nonpathogenic simian immunodeficiency virus infection of sooty mangabeys: implications for AIDS pathogenesis. *J Immunol*. 2007;178(3):1680-91.
74. Schacker TW, Brenchley JM, Beilman GJ, Reilly C, Pambuccian SE, Taylor J, et al. Lymphatic tissue fibrosis is associated with reduced numbers of naïve CD4+ T cells in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2006;13(5):556-60.

75. George MD, Verhoeven D, McBride Z, Dandekar S. Gene expression profiling of gut mucosa and mesenteric lymph nodes in simian immunodeficiency virus-infected macaques with divergent disease course. *J Med Primatol.* 2006;35(4-5):261-9.
76. Hatano H. Immune activation and HIV persistence: considerations for novel therapeutic interventions. *Curr Opin HIV AIDS.* 2013;8(3):211-6.
77. Zeng M, Southern PJ, Reilly CS, Beilman GJ, Chipman JG, Schacker TW, et al. Lymphoid tissue damage in HIV-1 infection depletes naïve T cells and limits T cell reconstitution after antiretroviral therapy. *PLoS Pathog.* 2012;8(1):e1002437.
78. Sankaran S, Guadalupe M, Reay E, George MD, Flamm J, Prindiville T, et al. Gut mucosal T cell responses and gene expression correlate with protection against disease in long-term HIV-1-infected nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(28):9860-5.
79. Canani RB, De Marco G, Passariello A, Buccigrossi V, Ruotolo S, Bracale I, et al. Inhibitory effect of HIV-1 Tat protein on the sodium-D-glucose symporter of human intestinal epithelial cells. *AIDS.* 2006;20(1):5-10.
80. Mohan M, Aye PP, Borda JT, Alvarez X, Lackner AA. Gastrointestinal disease in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques is characterized by proinflammatory dysregulation of the interleukin-6-Janus kinase/signal transducer and activator of transcription3 pathway. *Am J Pathol.* 2007;171(6):1952-65.
81. van Marle G, Gill MJ, Kolodka D, McManus L, Grant T, Church DL. Compartmentalization of the gut viral reservoir in HIV-1 infected patients. *Retrovirology.* 2007;4:87.
82. Tucker TG, Milne AM, Fournel-Gigleux S, Fenner KS, Coughtrie MW. Absolute immunoquantification of the expression of ABC transporters P-glycoprotein, breast cancer resistance protein and multidrug resistance-associated protein 2 in human liver and duodenum. *Biochem Pharmacol.* 2012;83(2):279-85.
83. George MD, Reay E, Sankaran S, Dandekar S. Early antiretroviral therapy for simian immunodeficiency virus infection leads to mucosal CD4+ T-cell restoration and enhanced gene expression regulating mucosal repair and regeneration. *J Virol.* 2005;79(5):2709-19.
84. Sheth PM, Chege D, Shin LY, Huibner S, Yue FY, Loutfy M, et al. Immune reconstitution in the sigmoid colon after long-term HIV therapy. *Mucosal Immunol.* 2008;1(5):382-8.
85. French MA, King MS, Tschampa JM, da Silva BA, Landay AL. Serum immune activation markers are persistently increased in patients with HIV infection after 6 years of antiretroviral therapy despite suppression of viral replication and reconstitution of CD4+ T cells. *J Infect Dis.* 2009;200(8):1212-5.

86. Piconi S, Trabattoni D, Gori A, Parisotto S, Magni C, Meraviglia P, et al. Immune activation, apoptosis, and Treg activity are associated with persistently reduced CD4+ T-cell counts during antiretroviral therapy. *AIDS*. 2010;24(13):1991-2000.
87. M M, T E, K F, M R, M LM, D G. Very early initiation of combination antiretroviral therapy results in normal levels of markers of immune activation XIX International AIDS Conference; Washington DC, USA2012.
88. Evering TH, Mehandru S, Racz P, Tenner-Racz K, Poles MA, Figueroa A, et al. Absence of HIV-1 evolution in the gut-associated lymphoid tissue from patients on combination antiviral therapy initiated during primary infection. *PLoS Pathog*. 2012;8(2):e1002506.
89. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Brecht B, Hagos E, Lampiris H, et al. T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2003;187(10):1534-43.
90. Marchetti G, Cozzi-Lepri A, Merlini E, Bellistri GM, Castagna A, Galli M, et al. Microbial translocation predicts disease progression of HIV-infected antiretroviral-naïve patients with high CD4+ cell count. *AIDS*. 2011;25(11):1385-94.
91. Merlini E, Bai F, Bellistri GM, Tincati C, d'Arminio Monforte A, Marchetti G. Evidence for polymicrobial flora translocating in peripheral blood of HIV-infected patients with poor immune response to antiretroviral therapy. *PLoS One*. 2011;6(4):e18580.
92. Deeks SG, Autran B, Berkhout B, Benkirane M, Cairns S, Chomont N, et al. Towards an HIV cure: a global scientific strategy. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(8):607-14.
93. Hatano H, Jain V, Hunt PW, Lee TH, Sinclair E, Do TD, et al. Cell-Based Measures of Viral Persistence Are Associated With Immune Activation and Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1)-Expressing CD4+ T cells. *J Infect Dis*. 2012.
94. Hatano H, Hayes TL, Dahl V, Sinclair E, Lee TH, Hoh R, et al. A randomized, controlled trial of raltegravir intensification in antiretroviral-treated, HIV-infected patients with a suboptimal CD4+ T cell response. *J Infect Dis*. 2011;203(7):960-8.
95. Raffatellu M, Santos RL, Verhoeven DE, George MD, Wilson RP, Winter SE, et al. Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes *Salmonella* dissemination from the gut. *Nat Med*. 2008;14(4):421-8.
96. Hunt PW. Th17, gut, and HIV: therapeutic implications. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;5(2):189-93.
97. Roy U, McMillan J, Alnouti Y, Gautum N, Smith N, Balkundi S, et al. Pharmacodynamic and antiretroviral activities of combination nanoformulated antiretrovirals in HIV-1-infected human peripheral blood lymphocyte-reconstituted mice. *J Infect Dis*. 2012;206(10):1577-88.

98. Nowacek AS, McMillan J, Miller R, Anderson A, Rabinow B, Gendelman HE. Nanoformulated antiretroviral drug combinations extend drug release and antiretroviral responses in HIV-1-infected macrophages: implications for neuroAIDS therapeutics. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2010;5(4):592-601.
99. Kanmogne GD, Singh S, Roy U, Liu X, McMillan J, Gorantla S, et al. Mononuclear phagocyte intercellular crosstalk facilitates transmission of cell-targeted nanoformulated antiretroviral drugs to human brain endothelial cells. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:2373-88.
100. Mira E, Mañes S. Immunomodulatory and anti-inflammatory activities of statins. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2009;9(3):237-47.
101. Baker JV, Huppler Hullsiek K, Prosser R, Duprez D, Grimm R, Tracy RP, et al. Angiotensin converting enzyme inhibitor and HMG-CoA reductase inhibitor as adjunct treatment for persons with HIV infection: a feasibility randomized trial. *PLoS One.* 2012;7(10):e46894.
102. Moore RD, Bartlett JG, Gallant JE. Association between use of HMG CoA reductase inhibitors and mortality in HIV-infected patients. *PLoS One.* 2011;6(7):e21843.
103. Ganesan A, Crum-Cianflone N, Higgins J, Qin J, Rehm C, Metcalf J, et al. High dose atorvastatin decreases cellular markers of immune activation without affecting HIV-1 RNA levels: results of a double-blind randomized placebo controlled clinical trial. *J Infect Dis.* 2011;203(6):756-64.
104. Paton NI, Goodall RL, Dunn DT, Franzen S, Collaco-Moraes Y, Gazzard BG, et al. Effects of hydroxychloroquine on immune activation and disease progression among HIV-infected patients not receiving antiretroviral therapy: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2012;308(4):353-61.
105. Piconi S, Parisotto S, Rizzardini G, Passerini S, Terzi R, Argentero B, et al. Hydroxychloroquine drastically reduces immune activation in HIV-infected, antiretroviral therapy-treated immunologic nonresponders. *Blood.* 2011;118(12):3263-72.
106. Murray SM, Down CM, Boulware DR, Stauffer WM, Cavert WP, Schacker TW, et al. Reduction of immune activation with chloroquine therapy during chronic HIV infection. *J Virol.* 2010;84(22):12082-6.
107. Bryn T, Yaqub S, Mahic M, Henjum K, Aandahl EM, Taskén K. LPS-activated monocytes suppress T-cell immune responses and induce FOXP3+ T cells through a COX-2-PGE2-dependent mechanism. *Int Immunol.* 2008;20(2):235-45.
108. Brudvik KW, Taskén K. Modulation of T cell immune functions by the prostaglandin E(2) - cAMP pathway in chronic inflammatory states. *Br J Pharmacol.* 2012;166(2):411-9.

109. Pettersen FO, Torheim EA, Dahm AE, Aaberge IS, Lind A, Holm M, et al. An exploratory trial of cyclooxygenase type 2 inhibitor in HIV-1 infection: downregulated immune activation and improved T cell-dependent vaccine responses. *J Virol.* 2011;85(13):6557-66.
110. Kvale D, Ormaasen V, Kran AM, Johansson CC, Aukrust P, Aandahl EM, et al. Immune modulatory effects of cyclooxygenase type 2 inhibitors in HIV patients on combination antiretroviral treatment. *AIDS.* 2006;20(6):813-20.
111. Read SW, DeGrazia M, Ciccone EJ, DerSimonian R, Higgins J, Adelsberger JW, et al. The effect of leflunomide on cycling and activation of T-cells in HIV-1-infected participants. *PLoS One.* 2010;5(8):e11937.
112. Cahn P, Ruxrungtham K, Gazzard B, Diaz RS, Gori A, Kotler DP, et al. The Immunomodulatory Nutritional Intervention NR100157 Reduced CD4+ T-Cell Decline and Immune Activation: A 1-Year Multicenter Randomized Controlled Double-Blind Trial in HIV-Infected Persons Not Receiving Antiretroviral Therapy (The BITE Study). *Clin Infect Dis.* 2013.
113. Klatt NR, Canary LA, Sun X, Vinton CL, Funderburg NT, Morcock DR, et al. Probiotic/prebiotic supplementation of antiretrovirals improves gastrointestinal immunity in SIV-infected macaques. *J Clin Invest.* 2013;123(2):903-7.
114. Schunter M, Chu H, Hayes TL, McConnell D, Crawford SS, Luciw PA, et al. Randomized pilot trial of a synbiotic dietary supplement in chronic HIV-1 infection. *BMC Complement Altern Med.* 2012;12:84.
115. Byakwaga H, Kelly M, Purcell DF, French MA, Amin J, Lewin SR, et al. Intensification of antiretroviral therapy with raltegravir or addition of hyperimmune bovine colostrum in HIV-infected patients with suboptimal CD4+ T-cell response: a randomized controlled trial. *J Infect Dis.* 2011;204(10):1532-40.
116. Hummelen R, Changalucha J, Butamanya NL, Koyama TE, Cook A, Habbema JD, et al. Effect of 25 weeks probiotic supplementation on immune function of HIV patients. *Gut Microbes.* 2011;2(2):80-5.
117. Hummelen R, Hemsworth J, Changalucha J, Butamanya NL, Hekmat S, Habbema JD, et al. Effect of micronutrient and probiotic fortified yogurt on immune-function of anti-retroviral therapy naive HIV patients. *Nutrients.* 2011;3(10):897-909.
118. Irvine SL, Hummelen R, Hekmat S, Looman CW, Habbema JD, Reid G. Probiotic yogurt consumption is associated with an increase of CD4 count among people living with HIV/AIDS. *J Clin Gastroenterol.* 2010;44(9):e201-5.
119. Lange J, Gazzard B, Diaz R. Reduced CD4+ T cell decline and immune activation by NR100157: a specific multi-targeted nutritional intervention in HIV-1 positive adults not on

antiretroviral therapy (BITE). ICAAC (Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy); San Francisco 2009.

120. Buzón MJ, Massanella M, Llibre JM, Esteve A, Dahl V, Puertas MC, et al. HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects. *Nat Med*. 2010;16(4):460-5.
121. Gandhi RT, Zheng L, Bosch RJ, Chan ES, Margolis DM, Read S, et al. The effect of raltegravir intensification on low-level residual viremia in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: a randomized controlled trial. *PLoS Med*. 2010;7(8).
122. Yukl SA, Shergill AK, McQuaid K, Gianella S, Lampiris H, Hare CB, et al. Effect of raltegravir-containing intensification on HIV burden and T-cell activation in multiple gut sites of HIV-positive adults on suppressive antiretroviral therapy. *AIDS*. 2010;24(16):2451-60.
123. Chege D, Kovacs C, la Porte C, Ostrowski M, Raboud J, Su D, et al. Effect of raltegravir intensification on HIV proviral DNA in the blood and gut mucosa of men on long-term therapy: a randomized controlled trial. *AIDS*. 2012;26(2):167-74.
124. Vallejo A, Gutierrez C, Hernandez-Novoa B, Diaz L, Madrid N, Abad-Fernandez M, et al. The effect of intensification with raltegravir on the HIV-1 reservoir of latently infected memory CD4 T cells in suppressed patients. *AIDS*. 2012;26(15):1885-94.
125. Wilkin TJ, Lalama CM, McKinnon J, Gandhi RT, Lin N, Landay A, et al. A pilot trial of adding maraviroc to suppressive antiretroviral therapy for suboptimal CD4⁺ T-cell recovery despite sustained virologic suppression: ACTG A5256. *J Infect Dis*. 2012;206(4):534-42.
126. Cuzin L, Trabelsi S, Delobel P, Barbuat C, Reynes J, Allavena C, et al. Maraviroc intensification of stable antiviral therapy in HIV-1-infected patients with poor immune restoration: MARIMUNO-ANRS 145 study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012;61(5):557-64.
127. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Epling L, Teague J, Jacobson MA, et al. Valganciclovir reduces T cell activation in HIV-infected individuals with incomplete CD4⁺ T cell recovery on antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2011;203(10):1474-83.
128. Dyavar Shetty R, Velu V, Titanji K, Bosinger SE, Freeman GJ, Silvestri G, et al. PD-1 blockade during chronic SIV infection reduces hyperimmune activation and microbial translocation in rhesus macaques. *J Clin Invest*. 2012;122(5):1712-6.

XV. Anexos

A. Quadros e tabelas

1. Quadro 1

Agente estudado	Propriedades que o agente possui que justificam o actual estudo	Particularidades do estudo	Resultados positivos	Resultados negativos	Referências
Inibidores da HMG CoA Reductase - Estatinas	Esta classe de fármacos apresenta efeitos anti-inflamatórios que podem ser benéficos para pacientes infectados por VIH, independentes do seu efeito de diminuição dos níveis de colesterol [Jain & Ridker (2005), citados por Baker (2012)]. Diminuem os níveis de citocinas pró-inflamatórias e de proteínas de fase aguda e parecem reprimir também os níveis de activação de linfócitos T (100).	RCT em pacientes sob HAART com viremias indetectáveis sem qualquer indicação para terapêutica com estatina ou lisinopril em que se estudou a viabilidade da administração do lisinopril (10mg/dia) VS L-placebo em combinação com pravastatina (20 mg/dia) VS P-Placebo	-O lisinopril foi associado com diminuição dos marcadores de AI sistémica	-A pravastatina não foi associada com diminuição dos marcadores de AI sistémica	Baker <i>et al.</i> (2012) (101)
		Estudo observacional em que se estudaram indivíduos sob HAART e sob estatinas no momento de iniciação da HAART e se compararam com indivíduos não tratados com estatina	-Indivíduos tratados com estatina apresentaram redução da mortalidade	-Não se associou a mortalidade com a diminuição da AI	Moore <i>et al.</i> (2011) (102)
		Administração de estatinas em indivíduos sob HAART, e em indivíduos não tratados	-Demonstraram alterações modestas mas estatisticamente significativas na activação de células T	-Não se observaram efeitos nas contagens de CD4 ⁺	Ganesan <i>et al.</i> (2011) (103)
Cloroquina e hidroxicloroquina	Estes agentes apresentam propriedades imunomodulatórias e anti-inflamatórias [Gilman <i>et al.</i> (2000), citados por Paton <i>et al.</i> (2012)]. Inibem a acidificação endossómica em pDCs e a sinalização TLR-7 pelo RNA do VIH-1 e inibem a produção de INF- α [Beignon AS <i>et al.</i> (2005), citados por Rajasuriar <i>et al.</i> (2013)], tendo sido observadas propriedades anti-VIH <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> [Savarino	RCT com hidroxicloroquina 400 mg VS placebo, diariamente durante 49 semanas, administrada a 83 pacientes não tratados com HAART e com contagens CD4 ⁺ > 400 células/ μ L, para determinar se há diminuição da AI e lentificação da diminuição de CD4 ⁺		-Não demonstrou alterações na activação nem proliferação dos CD8 ⁺ -Levou a um aumento no RNA viral e a uma diminuição nas contagens de CD4 ⁺	Paton <i>et al.</i> (2012) (104)
		-Pequeno estudo não randomizado, com administração de hidroxicloroquina 400 mg/dia, durante 6 meses, a 20 indivíduos infectados que não responderam à terapêutica HAART	-Redução de LPS plasmático -Redução das % de CD4 ⁺ activados -Aumento das Tregs -Aumento das DCs -Redução da IL-6 e TNF- α	-Sem aumento significativo nas contagens de CD4 ⁺	Piconi <i>et al.</i> (2011) (105)

	<i>et al.</i> (2001), citados por Paton <i>et al.</i> (2012)].	RCT que testou os efeitos da cloroquina em doentes cronicamente infectados pelo VIH com contagens de CD4 > 250 células/mL	Diminui: -Activação de CD8 ⁺ de memória (diminuição da expressão CD38) -Proliferação CD4 ⁺ e CD8 ⁺ -Níveis de LPS plasmático	-Não provocou alterações na carga viral	Murray <i>et al.</i> (2010) (106)
Inibidores selectivos da Cicloxigenase -2 (COX-2)	Foi observado que níveis aumentados de AMP cíclico (cAMP) contribuem para a disfunção das células T em pacientes infectados [Johansson <i>et al.</i> (2004), citados por Pettersen <i>et al.</i> (2011)]. Níveis elevados de cAMP nos linfócitos T de indivíduos infectados podem resultar do aumento de produção da prostaglandina E2 após a produção induzida por activação da COX-2 [Aandahl <i>et al.</i> (1998), citados por Pettersen <i>et al.</i> (2011)]. Elevadas quantidades de COX-2 são produzidas <i>de novo</i> em monócitos, principalmente após exposição a LPS (107). Estes são agentes anti-inflamatórios que modulam a activação das células T através da inibição da PGE2 (108) e da via da cAMP [Torgersen <i>et al.</i> (2002), citados por Rajasuriar <i>et al.</i> (2013)].	-RCT em doentes não tratados com administração de altas doses de celecoxib durante 12 semanas	-Redução significativa nos níveis de activação imune: redução da densidade do CD38 nas células CD8 ⁺ , dos níveis de IgA e de um <i>score</i> combinado de marcadores inflamatórios, da expressão de PD-1 na superfície dos linfócitos T CD8 ⁺		Pettersen <i>et al.</i> (2011) (109)
		-RCT para estudo dos efeitos imunomoduladores da combinação da HAART + rofecoxib e de HAART + celecoxib após 12 semanas de administração.	- Ambos os inibidores da COX-2 testados, conjuntamente com a HAART melhoraram os marcadores de AI persistente	-Proliferação aumentada de células T; -Aumento de células CD8 ⁺ que contêm perforina.	Kvale <i>et al.</i> (2006) (110)
Leflunomida	Agente anti-AR que apresenta um metabolito activo, o A77 1726, que tem actividade anti-VIH [Schlapfer <i>et al.</i> (2003), citados por Rajasuriar <i>et al.</i> (2013)] e reduz a proliferação de células T ativadas in vitro [Cherwinski et al. (1995), citados por Rajasuriar <i>et al.</i> (2013)]	RCT que testou a administração de leflunomida durante 28 dias em doentes não tratados com HAART	-Diminuiu a expressão de marcadores de activação nas células T CD8 ⁺ no sangue periférico. -diminui a expressão de co-receptores (CCR5 e CXCR4) para o VIH-1 quer nas células T CD4 ⁺ quer das T CD8 ⁺	-Sem alterações significativas nos subconjuntos de células T de memória e <i>naive</i> ; -Sem alterações na apoptose das células T e nos marcadores de AI -Sem alterações nas cargas virais plasmáticas	Read <i>et al.</i> (2010) (111)
		Observação: Não é claro se efeitos imunológicos semelhantes serão vistos em doentes sob HAART.			

Agentes biológicos - Colostrums bovinos, micronutrientes e pré/próbióticos	Na infecção por VIH há uma sobre-representação das microorganismos patogénicos e oportunistas, como a <i>Candida albicans</i> e a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , e uma sub-representação daquelas benéficas, como bifidobactérias e lactobacilos (9). Assim, várias abordagens estão actualmente a ser testadas para modificar este desequilíbrio, como suplementação com micronutrientes, colostros bovinos, pró* e pré-bióticos* ¹ . Todas podem alterar a composição da microflora intestinal, podendo modular a AI derivada da translocação microbiana (71, 91). A suplementação de micronutrientes, como o complexo B, Vitamina C e E, foram associados a redução da mortalidade e progressão do VIH [Fawzi <i>et al.</i> (2004), citados por Hummelen <i>et al.</i> (2011)], mas até agora o seu efeito não melhorou a disfunção da barreira intestinal [Kelly <i>et al.</i> (2010), citados por Hummelen <i>et al.</i> (2011)]. Os suplementos pré e pró-bióticos melhoraram os resultados em várias doenças caracterizadas por inflamação gastrointestinal. [Marteau <i>et al.</i> (2011), citados por Klatt <i>et al.</i> (2013)]. Os colostros bovinos contêm títulos muito altos de anticorpos activos contra uma grande variedade de patógenos virais, bacterianos e protozoários, assim como contra várias toxinas bacterianas [Pakkanen <i>et al.</i> (1997), citados por Kaducu <i>et al.</i> (2011)].	Estudo realizado com primatas que comparou os resultados de HAART VS HAART + pré/próbióticos	-Suplementação com pré/próbióticos demonstrou melhorias na imunidade intestinal (aumento dos T CD4 ⁺ e diminuição da fibrose)		Klatt <i>et al.</i> (2013) (113)
	RCT no qual, a 340 indivíduos adultos infectados não tratados com HAART, com contagens T CD4 ⁺ >800 células/μL, foi administrado NR100157 ou o placebo.	O grupo a que foi administrado o NR100157 mostrou: -Redução significativa do declínio das células T CD4 ⁺ ; -diminuição dos marcadores de AI.		Cahn <i>et al.</i> (2013) (112)	
	RCT em que se avaliou a administração do Synbiotic 2000® durante 4 semanas para avaliação do seu efeito nos níveis de translocação microbiana e AI		-Não se observou diminuição da translocação microbiana e AI	Schunter <i>et al.</i> (2012) (114)	
	RCT para determinação do efeito da intensificação da HAART com a administração de <i>colostrums</i> bovinos hiperimunes ou com o raltegravir nas contagens de células CD4 ⁺ .		-Comparativamente com o placebo, nem a adição que do raltegravir nem dos colostrums à HAART durante 24 semanas resultou em aumento nas contagens de CD4 ⁺	Byakwaga <i>et al.</i> (2011) (115)	
	RCT em que se avaliou o impacto da utilização de 25 semanas de pró-bióticos, em 25 mulheres infectadas não tratadas com HAART		-Não se observaram melhorias na função imune das mulheres estudadas.	Hummelen <i>et al.</i> (2011) (116)	
	RCT em que se comparou a implementação de um iogurte suplementado com micronutrientes e probiótico VS iogurte suplementado apenas com micronutrientes, em 112 pacientes não tratados com HAART	-A adição de probióticos a um iogurte fortificado com micronutrientes foi bem tolerado -Aumentos dos níveis de hemoglobinas em todos os indivíduos	-Não houve aumento das contagens de CD4 ⁺ após um mês.	Hummelen <i>et al.</i> (2011) (117)	
	RCT com administração de um suplemento dietético com uma mistura de oligossacarídeos probióticos em indivíduos infectados não tratados com HAART VS placebo e estudo de possíveis efeitos imunomoduladores	-Melhoria da composição da flora intestinal (aumento das bifidobactérias, diminuição do <i>Clostridium lituseburens</i> / <i>Clostridium histolyticum</i> patogénicos) -Redução do CD14 solúvel; -Redução das células T CD4 ⁺ activadas; -Aumento da actividade das células NK		Gori <i>et al.</i> (2011) (71)	

	O produto nutricional imunomodulatório NR100157 (que contém oligossacarídeos pré-bióticos) foi desenvolvido especialmente para indivíduos infectados pelo VIH-1 (112).				
		Estudo retrospectivo observacional, com comparação das contagens de CD4 ⁺ nos participantes antes e durante o consumo de iogurtes probióticos e com um grupo controlo que não consumiu os iogurtes.	-Aumentos das contagens de CD4 ⁺ entre os consumidores infectados		Irvine <i>et al.</i> (2010) (118)
		RCT recente em que foi administrado um suplemento nutricional incluindo <i>colostrums</i> bovinos, oligossacarídeos e ácidos gordos n2-poli-insaturados (restauradores da flora gastrointestinal e/ou melhoradores da integridade da mucosa)	-Diminuiu a taxa de declínio de células T CD4 ⁺ nos indivíduos infectados não tratados	-Não houve nenhum efeito aparente nos níveis de RNA viral plasmáticos	Lange <i>et al.</i> (2009) (119)
	<p>*Probiótico - ingrediente alimentar vivo microbiano que é benéfico para a saúde [McFarland <i>et al.</i> (2006), citados por Schunter <i>et al.</i> (2012)].</p> <p>*¹Pré-biótico - é um ingrediente alimentar não digerível, normalmente oligossacarídeos, que afecta positivamente o hospedeiro por estimular selectivamente o crescimento e a actividade de uma ou de um número limitado de bactérias no cólon, desta forma melhorando a saúde do hospedeiro [Gibson <i>et al.</i> (1995), citados por Schunter <i>et al.</i> (2012)].</p> <p>Quando pró e pré-bióticos são providenciados em conjunto contituem um simbiótico (114).</p>				
Tratamento antiretroviral	A AI crónica em pacientes que recebem HAART também pode ser devida a replicação de baixo nível (51). A análise de ensaios clínicos de fase 2 e de fase 3 para investigação de fármacos anti-retrovíricos concluiu que o aumento nas células T CD4 ⁺ em grupos que continham um antagonista do CCR5 na HAART (como o maraviroc) era superior àquelas que não o tinham [Wilkin <i>et al.</i> (2010), citados por Timothy <i>et al.</i> (2012)]. Por outro lado, alguns modelos matemáticos previram que a intensificação da terapêutica com raltegravir pode resultar na redução da viremia residual [Murray <i>et al.</i> (2007), citados por Chege <i>et al.</i> (2012)]. O raltegravir é um inibidor da integrase, bloqueando a integração do cDNA viral linear que	Estudos observacionais e RCTs em que se intensificou a HAART com raltegravir	-em (121) houve aumento dos CD4 ⁺ com a administração do raltegravir em comparação com o início do tratamento - em (122) houve a tendência para a diminuição da activação dos linfócitos em todos os locais, e uma tendência para aumento dos CD4 ⁺ no íleo.	-Não diminuíram os níveis de RNA viral e DNA pró-virais no sangue ou intestino -Não aumentou as contagens CD4 ⁺ (excepto (121)) -Não reduziu significativamente da AI no plasma ou tecidos	-Hatano <i>et al.</i> (2011) (94) - Byakwaga <i>et al.</i> (2011) (115) -Gandhi <i>et al.</i> (2011) (121) -Yukl <i>et al.</i> (2010) (122) -Chege <i>et al.</i> (2012) (123)
		-Em ambos os estudos se analisou a intensificação da HAART com raltegravir após 48 semanas de administração	-Redução significativa dos marcadores de activação das células T CD8 ⁺ (medida como a fracção de células CD8 ⁺ que expressam CD38 ⁺ e/ou HLA-DR) num subconjunto dos pacientes -Redução das dimensões do reservatório latente		-Buzón <i>et al.</i> (2010) (120) -Vallejo <i>et al.</i> (2012) (120, 124)
		Observação: são necessários mais estudos para determinar o impacto do raltegravir na intensificação da AI.			
		Dois estudos em que se intensifica uma HAART estável com a adição do maraviroc (um antagonista do CCR5) durante 24	-diminuição da activação de células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ -diminuição dos marcadores de	-a intensificação não aumentou significativamente as contagens de T CD4 ⁺	-Wilkin <i>et al.</i> (2012) (125) -Cuzin <i>et al.</i> (2012)

	é subsequentemente circularizado por enzimas reparadoras do DNA hospedeiras para formar episómos contendo duas cópias da repetição viral longa terminal (2 LTR), ou que sofre recombinação para formar um círculo LTR (120).	semanas.	apoptose (uma grande causa de perda de CD4 ⁺) dos CD4 ⁺ e dos CD8 ⁺		(125, 126)
		Um estudo em que se intensifica a HAART com o maraviroc		-Aumento inesperado na AI	[Hunt <i>et al.</i> (2012), citados por Rajasuriar <i>et al.</i> (2013)]
		Observação: Mais estudos são necessários para melhor caracterizar as alterações imunológicas associadas com o uso do maraviroc			
Tratamento de co-infecções	Colocou-se a hipótese que o tratamento das co-infecções, muito comuns em indivíduos infectados e muitas vezes assintomáticas, poderia reduzir os níveis de AI sistêmica (76).	RCT recente em pacientes sob HAART e soropositivos para CMV com contagens de T CD4 ⁺ inferiores a 350 células/μL que foram randomizados para receber valganciclovir 900 mg VS placebo durante 8 semanas		-O grupo do valganciclovir apresentou uma diminuição significativa nos níveis de activação das células T CD8 ⁺	Hunt <i>et al.</i> (2011) (127)
Inibidores da ECA	Esta classe de fármacos apresenta efeitos anti-inflamatórios que podem ser benéficos para pacientes infectados por VIH [Montecucco <i>et al.</i> (2009), citados por Baker (2012)]	RCT em pacientes sob HAART com níveis de viremia indetectáveis sem qualquer indicação para terapêutica com estatina ou lisinopril em que se estudou a viabilidade da administração do lisinopril (10mg/dia) VS L-placebo em combinação com pravastatina (20 mg/dia) VS P-Placebo	-O lisinopril foi associado com diminuição dos marcadores de AI sistêmica	-A pravastatina não foi associada com diminuição dos marcadores de AI sistêmica	Baker <i>et al.</i> (2012) (101)
Anticorpo Anti-PD-1	Uma característica das infecções crónicas patológicas em primatas por vírus de imunodeficiência é a exaustão e disfunção de respostas de células B e T anti-virais, que contribuem para a incapacidade do hospedeiro de eliminar o patógeno viral persistente [El-Far <i>et al.</i> (2008), citados por Estes <i>et al.</i> (2012)]. Esta exaustão nas células T é caracterizada pelo aumento da expressão do receptor inibitório de morte programada 1 (PD-1) [Sharpe <i>et al.</i> (2007), citados por Shetty <i>et al.</i> (2012)]. Também já foi sugerido que a upregulation da PD-1 mediada por AI pode contribuir para reconstituição das células CD4 ⁺ subótima durante a HAART (93).	Administração de um anticorpo anti-PD1 humano a 9 macacos infectados com o VIS – 5 destes receberam o anticorpo 10 semanas depois da infecção (fase crónica precoce), e os outros 4 receberam-no 90 semanas após a infecção (fase crónica tardia) e analisou-se se tal como no modelo do vírus linfocítico coriomeningo murino (LCMV), resultava em restauração da função das células T específica para o vírus [Zajac <i>et al.</i> (1998), citados por Estes <i>et al.</i> (2012)].	-Aumento da imunidade específica para o VIS -Redução da AI e translocação microbiana mesmo em condições de viremias muito altas -Restauração da integridade da barreira GI -Diminuição das infecções oportunistas -Maior sobrevivência do grupo que recebeu o anticorpo		Dyavar <i>et al.</i> (2012) (128)
		Observação: Os efeitos deste bloqueio na redução da AI pode ser o resultado de uma imunidade aumentada contra bactérias patogénicas do intestino e da reparação da barreira. Este estudo sugere que combinando o bloqueio dos receptores PD-1 com a HAART se possam melhorar os benefícios desta última por melhoria da imunidade contra infecções oportunistas e redução de translocação microbiana e activação hiperimune.			

2. Quadro 2

Agente em estudo	Propriedades que o agente possui que justificam o actual estudo	Referência
Rifaximina AIDS Clinical Trial Group (ACTG) 5386	Antibiótico oral minimamente absorvido de grande espectro de atividade bactericida que se concentra no trato gastrointestinal	(76)
Sevelamer ACTG 5296	Um ligante do fosfato oral usado em pacientes em diálise que se liga à endotoxina bacteriana no intestino	(76)
Mesalamina ClinicalTrials.gov NCT01090102	Um fármaco anti-inflamatório oral usado no tratamento de pacientes com doença inflamatória intestinal e que actua localmente no intestino diminuindo a inflamação	(76)
Cloroquina (NCT00819390) e Hidroxicloroquina (NCT01232660)	Já referidas no quadro anterior.	(50)
Estudos com o objetivo de reverter a PD-1 em indivíduos infectados sob HAART supressiva (ACTG 5301)	Como resposta à inflamação aumentada e para prevenção do dano a ela associado, as células T sobrerregulam a expressão de alguns reguladores negativos (como a PD-1 e CTL-4) [Keir <i>et al.</i> (2006), citados por Hatano (2013)]. Como as células T ativadas são mais facilmente infectadas, a expressão destes reguladores negativos pode ser um marcador da infecção de uma célula. Em alguns estudos com primatas e alguns estudos oncológicos em humanos a inibição das vias da PD-1 levou a melhoria da função das células T.	(76)

3. Quadro 3

Agente em estudo	Propriedades que o agente possui que justificam o actual estudo	Particularidades do estudo	Referência
Inibidor da ECA (ClinicalTrials.gov NCT01535235)	O processo de deposição de colagénio pode ser iniciado pela libertação em excesso de TGF- β 1 pelas células T [Schacker <i>et al.</i> (2002), citados por Hatano (2013)]. A ACE localiza-se em múltiplos órgãos e converte a angiotensina I (AT1) em angiotensina II (AT2). A AT2 é pró-inflamatória e induz fibrose através do aumento dos níveis de TGF- β 1 [Border <i>et al.</i> (1994), citados por Hatano (2013)] e daí o potencial uso dos iECA como anti-fibróticos.	Administração de lisinopril em indivíduos infetados sob HAART supressiva para se avaliar se há diminuição da AI, reversão da fibrose em tecidos linfóides e se há o desenvolvimento de respostas imunes mais específicas para o VIH e uma <i>clearance</i> mais rápida do reservatório latente.	(76)
Bloqueadores dos receptores da angiotensina (ACTG 5317)	As mesmas do estudo anterior.		(76)

B. Legendas

1. Quadros

Quadro 1 – Representação sintetizada em tabela dos objetivos e resultados de alguns estudos realizados com agentes que potencialmente poderão contribuir para a diminuição da activação imune em doentes infetados pelo VIH.

Quadro 2 – Agentes actualmente em estudo para avaliação do efeito na translocação microbiana, e assim, na activação imune.

Quadro 3 – Agentes actualmente em estudo para avaliação do seu potencial efeito anti-fibrótico nos tecidos linfóides.